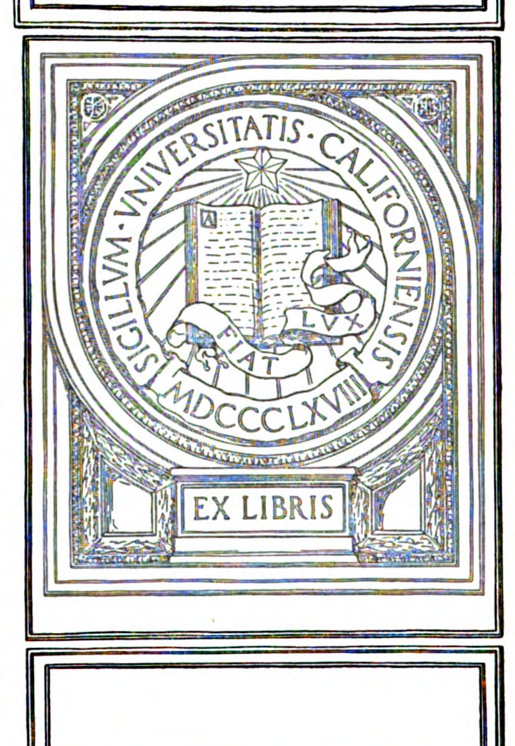
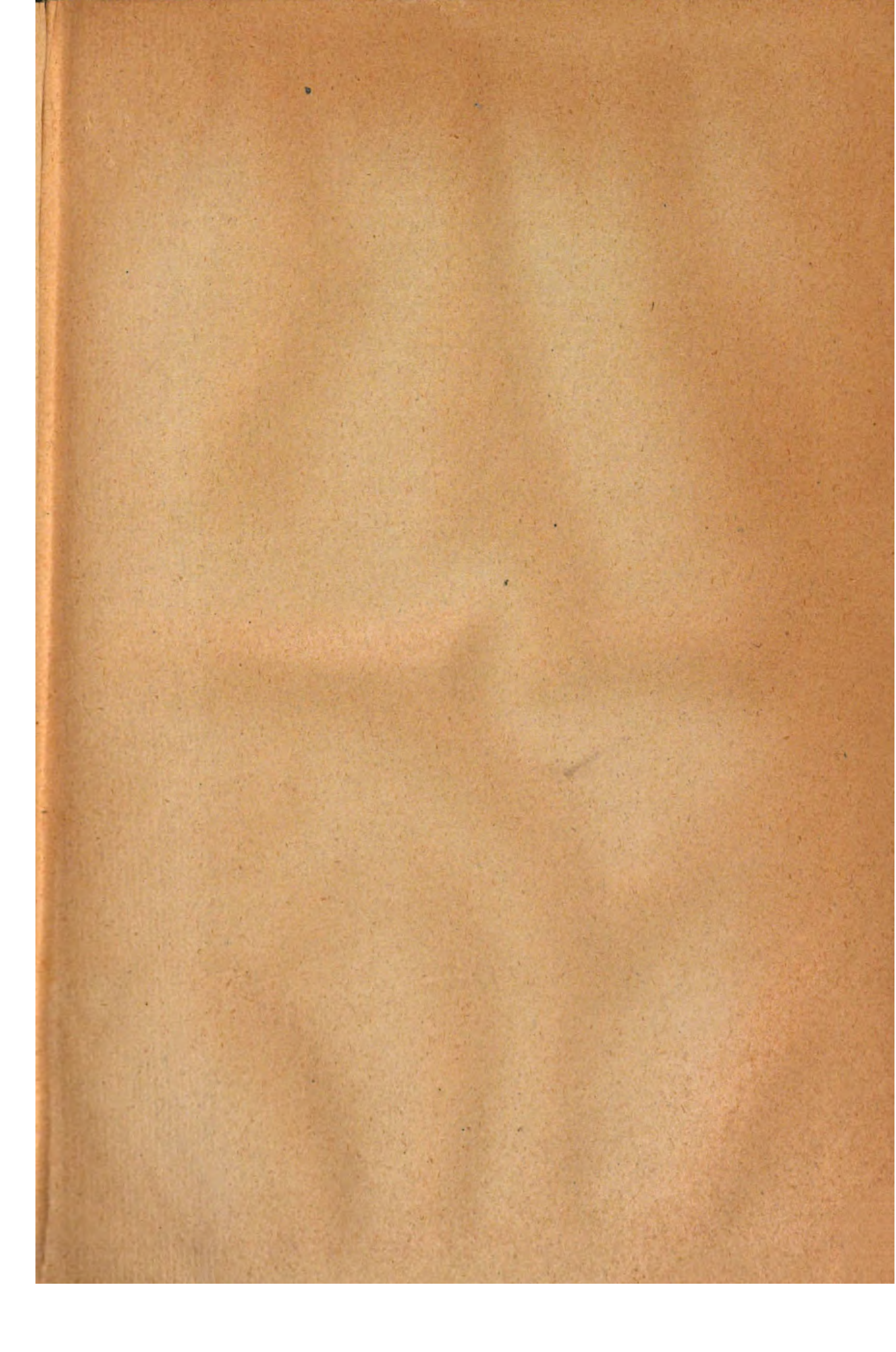



SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS

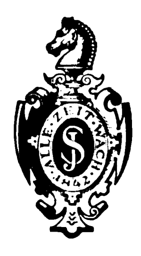


Biochemische Zeitschrift

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertsechzigster Band



Berlin

Verlag von Julius Springer

1925

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhalt.

Niere und Aminosäureausscheidung.

Von

Ernst Schmitz und **Paul Siwon.**

(Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 25. April 1925.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

Der Harn weist gegenüber dem Plasma, aus dem er durch die Tätigkeit der Niere hervorgeht, einschneidende Unterschiede in qualitativer und quantitativer Beziehung auf. Bei den meisten der gemeinsamen Bestandteile bemerken wir Konzentrationsunterschiede sehr wechselnden Grades. So wird die Menge der Chloride annähernd verdoppelt, die der Schwefelsäure, wenn man ihre Konzentration im Blute mit *Denis*[1]) zu 3 mg-Proz. annimmt, auf etwa das 50- bis 60fache gesteigert. Legt man für die Konzentration von Harnstoffstickstoff, Harnsäure und Kreatinin im Blute die Werte 20 mg, 3 mg und 1,5 mg in 100 ccm, für den Harn eine Tagesmenge von 1500 ccm und eine Ausscheidung von 15 g Harnstoff-N, 750 mg Harnsäure und 1,5 g Kreatinin zugrunde, so gelangt man zu Konzentrationsverhältnissen von 1 : 50, 1 : 16.6 und 1 : 66,5 für die drei genannten organischen Harnbestandteile.

Noch kennzeichnender sind einige qualitative Unterschiede. Erst in der Niere kommen Hippursäure und Ammoniak zu den aus dem Blute entnommenen Harnbestandteilen hinzu. Andererseits fehlen im normalen Harn Eiweiß, Zucker und Fett, allgemeiner gesagt Lipoide, vollständig. Während nun dem Durchtritt von Eiweiß und Fett wegen ihrer kolloidalen Natur die tierischen Membranen allgemein ein unüberwindliches Hindernis entgegensetzen, ist das für die leicht löslichen und leicht diffusiblen Zucker anders. Hier muß entweder eine Abdichtung des Nieren„filters" oder eine Rückresorption des etwa filtrierten Zuckers angenommen werden.

Die angeführten Beispiele mögen genügen, um zu zeigen, daß die Niere Menge und Art der in den Harn übergehenden Stoffe kontrolliert.

---

[1]) *W. Denis*, Journ. of biol. Chem. **49**, 311, 1921.

Die Bedeutung dieser Einrichtung liegt klar zutage: mit ihrer Hilfe erhält die Niere dem Körper die optimale Zusammensetzung seiner Säfte und verhindert, daß von den wertvollen Baustoffen und Energiequellen, die im Blute enthalten sind, etwas verloren gehe.

Von dieser Tätigkeit der Niere nun gibt es eine merkwürdige Ausnahme. Das Eiweiß ist im Plasma begleitet von seinen kleinsten Bausteinen, den Aminosäuren. Ihre Menge erscheint zwar klein, 100 ccm Plasma enthalten etwa 7 mg Aminosäure-N gegenüber der zwei- bis dreifachen Menge von Harnstoff-N. Diese Zahlen gewinnen aber an Bedeutung, wenn man die außerordentlich hohe Avidität der Gewebe für Aminosäuren berücksichtigt[1]) und die hohe Umlaufszahl des Blutes im Organismus in Rechnung stellt. In der Tat hat sich denn auch, vor allem durch die Arbeiten von *Folin* und seinen Mitarbeitern[2]) herausgestellt, daß es gerade die Aminosäuren sind, in deren Form den Organen der aus dem Darmkanal aufgesaugte Eiweißstickstoff zur Deckung ihres Bedarfs zugeführt wird. Die Aminosäuren stellen also unter den Blutbestandteilen einen der allerwertvollsten dar.

Nun ist es aber schon 1908 *Embden* gelungen, eine dieser Aminosäuren, das Glykokoll, im normalen menschlichen Harn nachzuweisen[3]), und bald folgten andere Forscher, die daneben Alanin und Histidin feststellen konnten[4]). In der Folge wurden verschiedene quantitative Verfahren gefunden, mit deren Hilfe man den gesamten Aminosäurestickstoff des Harns bestimmen kann, und es zeigte sich, daß dessen Menge bedeutend über den Betrag hinausgeht, den man mit Hilfe der präparativen Verfahren fassen kann. Beim Erwachsenen sind ungefähr 2,2 Proz. des Stickstoffs einer Harntagesmenge in Aminosäuren enthalten, beim Säugling macht dieser Anteil das Doppelte, bei frühgeborenen Kindern in der Regel noch mehr aus.

Damit gehen also dem Körper dauernd Stoffe verloren, die, selbst wenn sie als Körperbausteine ihre Rolle ausgespielt haben sollten, doch zum mindesten noch ein wertvolles Brennmaterial darstellen. Wir sehen hier einen Gegensatz im Verhalten der Niere zu den Zuckern, von denen sie die dem Körper nützlichen zurückhält und nur die nicht abbaufähigen passieren läßt, und den Aminosäuren, von denen sie einen nicht unbeträchtlichen Teil zu Verlust gehen läßt. Dieser Vorgang besitzt größtes Interesse nicht nur für den Physiologen, sondern auch für den Kliniker. Wissen wir doch, daß eine Reihe von Prozessen, bei denen ein gesteigerter Abbau von Organeiweiß stattfindet, sich auch in einer Zunahme der Aminosäurefraktion des

---

[1]) *K. Stolte*, Zeitschr. f. Chem., Phys. u. Pathol. **5**, 15, 1904; *S. Rosenbaum*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **41**, 420, 1924.

[2]) *O. Folin* und *H. Berglund*, Journ. of biol. Chem. **51**, 395, 1922.

[3]) *G. Embden* und *H. Reese*, Hofmeisters Beitr. **7**, 441, 1905.

[4]) *Engeland*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **57**, 49, 1908.

Harns zu erkennen gibt. So ist denn auch schon in verschiedenen Arbeiten die Frage behandelt worden, von welchen Faktoren der Umfang der Aminosäureausscheidung durch die Niere abhängt.

Nachdem schon frühere Forscher eine Erhöhung der Aminosäureausfuhr unter dem Einfluß ausgiebiger Zufuhr gefunden hatten, verglichen *Folin* und *Berglund* in ihrer genannten Arbeit die Schwankungen des Aminosäuregehalts, die im Anschluß an stellenweise allerdings exzessiv hohe Gaben von Eiweiß oder Glykokoll in Blutplasma und Harn eintraten. Es stellte sich heraus, daß eine Erhöhung des Aminosäurespiegels im Blute auch eine Steigerung der Ausfuhr zur Folge hat. Zahlenmäßig formulierbare Beziehungen, wie sie z. B. *Ambard* für das Verhältnis des Harnstoffgehalts im Plasma zu dem Betrage der Ausfuhr annimmt, traten allerdings nicht hervor. *Folin* und *Berglund* nehmen an, daß die Intensität, mit der die Niere und die anderen Organe sich mit Aminosäuren beladen können, für die Ausscheidung maßgebend ist.

Daß die Aufladung der Gewebe mit Aminosäuren in der Tat eine große Rolle spielt, geht unzweideutig aus Versuchen von *Nonnenbruch* und *Gottschalk* hervor[1]). Diese Autoren verabreichten Aminosäuregemische (Rektamin), nachdem die Versuchsperson längere Zeit hindurch nur ein Minimum an Eiweiß erhalten hatte, die Avidität der Gewebe zu den Aminosäuren also sicherlich außerordentlich gesteigert war. Eine Steigerung im Harn trat unter diesen Umständen nicht ein. Nach zehntägiger Dauer des Versuchs konnten sogar 100 g Casein auf einmal zugeführt werden, ohne daß sich die Aminosäureausfuhr erhöhte. Das Stickstoffdefizit von 12 g, das im Laufe des Versuchs entstanden war, wurde an diesem einen Tage gedeckt. Eine beträchtliche Vermehrung der Aminosäuren im Harn trat dagegen hervor, wenn das gleiche Aminosäuregemisch rektal zugeführt wurde. In diesem Falle gelangt es durch die Venae hämorrhoidales und hypogastricae direkt in die Vena cava inferior, erreicht also die Niere, ohne vorher die Leber und andere Organe passiert zu haben. Es ließen sich so Steigerungen des Aminostickstoffs auf 12 Proz. des Gesamtstickstoffs im Harn erzielen. Ein Einfluß des Aminosäuregehalts in dem die Niere durchströmenden Blute auf die Ausfuhr ist also auch hier klar erkennbar.

Andererseits findet die Aminosäureausscheidung in der Niere nicht etwa nur bei besonders hohen Gehalten im Blute statt, denn auch während des eiweißarmen Regimes verschwanden die Aminosäuren nicht aus dem Harn; die absoluten Mengen waren zwar herabgesetzt, der prozentische Anteil an der Stickstoffausfuhr aber wegen der kleinen Gesamtstickstoffmenge eher gesteigert. Die Aminosäurefraktion des Harns zerfällt damit in einen endogenen, von der Ernährung unabhängigen, und einen exogenen, von den meist alimentär bedingten Steigerungen des Aminosäuregehalts im Blut abhängigen Anteil.

Dieses Versuchsresultat stimmt mit älteren Erfahrungen, vor allem der Pädiater, überein. Danach scheidet das Neugeborene schon am ersten Lebenstage, bevor es irgendwelche Nahrung aufgenommen hat, Aminosäuren aus, deren Menge steigt aber mit dem Beginn der Nahrungsaufnahme und bis zum Ende der Neugeborenenperiode ständig an[2]). Also auch hier

---

[1]) *W. Nonnenbruch* und *Gottschalk*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **99**, 261, 270, 300, 1923.

[2]) *S. Simon*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **2**, 1, 1911.

ein endogener und ein alimentär bedingter Anteil. Der letztere zeigt sich auch in den Versuchen von *Brugsch* und *Hirsch*[1]), die eine Abnahme der Aminosäureausscheidung im Hunger nachweisen konnten.

Über einen Einfluß der Niere auf die Aminosäureausscheidung sagen alle diese Versuche nichts aus. Gerade dieser Punkt ist aber von besonderem physiologischen Interesse, da es schwer ist, sich mit der Tatsache abzufinden, daß ein Organ, das den übrigen Blutbestandteilen gegenüber eine so feine Abstimmung erkennen läßt, gerade einem der wertvollsten gegenüber sich passiv verhalten sollte.

Diese Erwägung rief in uns den Wunsch hervor, zu prüfen, ob vielleicht zu den Faktoren, von denen der endogene Anteil der Aminosäureausscheidung abhängt, die wechselnde Beanspruchung der Niere gehört. Für das Eisen des Harns hat *Ehrenberg*[2]) nachgewiesen, daß seine Menge im Harn um so größer ist, je stärker die der Niere zugemuteten Arbeitsleistungen sind. Wir fanden hierüber zunächst nur eine Äußerung von *Folin* und *Berglund*, die einen Einfluß der Diurese im allgemeinen annehmen zu können glauben. Nur bei einem ihrer Versuche, indem sie Casein das eine Mal in gespaltenem Zustande, das andere Mal in einer großen Menge von Wasser suspendiert gereicht hatten (Tafel V und VI) , lassen sie die Vermutung zu, daß vielleicht die höhere Wasserausscheidung im zweiten Falle die Aminosäureausscheidung begünstigt haben könnte. Besondere Versuche über den Einfluß der Diurese, also ohne Zulage von Aminosäuren, haben *Folin* und *Berglund* nicht ausgeführt.

Dagegen hat *Goebel* in seiner Arbeit, die uns leider erst nach Abschluß unserer Versuche bekannt wurde[3]), festgestellt, daß die gleiche Eiweißmenge beim Säugling zu einer wesentlich höheren Aminoacidurie führt, wenn die gleichzeitig genommene Wassermenge verdoppelt wird. *Goebel* führt die höhere Aminosäureausscheidung, die der Säugling auch unter normalen Bedingungen zeigt, auf den höheren Wassergehalt seiner Nahrung gegenüber der des Erwachsenen zurück[4]).

Zu einer weiteren Fragestellung führten die Beobachtungen von *Folin* und *Berglund* über den Zusammenhang zwischen der Aminosäurekonzentration im Blute und der Höhe der Ausscheidung. Wir wissen aus den Untersuchungen von *Thomas*[5]), daß die einzelnen Eiweißkörper in sehr verschiedenem Grade befähigt sind, für zer-

---

[1]) *Brugsch* und *R. Hirsch*, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther. **4**, 947, 1907.

[2]) *R. Ehrenberg* und *A. Karsten*, Pflügers Arch. **193**, 86, 1921.

[3]) *F. Goebel*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **34**, 94, 1922.

[4]) *F. Goebel* und *F. v. Bernuth*, Untersuchungen über die Aminosäureausscheidung des Säuglings im Hungerzustande, diese Zeitschr. **146**, 336, 1924.

[5]) *O. Folin*, Journ. of biol. Chem. **51**, 393, 1922.

fallendes Körpereiweiß einzutreten. Die Unterschiede in dieser „biologischen Wertigkeit“ sind viel ausgeprägter, als die in der qualitativen Zusammensetzung der Proteine aus den einzelnen Aminosäuren. Am hochwertigsten fand *Thomas* die Eiweißkörper des Rindfleisches und unserer üblichen Konsumfische, auf mittlerer Linie bewegt sich das Casein, während die Proteine der Leguminosen am unteren Ende der Reihe stehen. Es erschien nun möglich, daß bei Verwendung eines biologisch geringwertigen Proteins die in das Blut gelangten Bausteine von den Geweben nicht ganz mit der gleichen Leichtigkeit aufgenommen würden, wie das bei Verwendung hochwertiger Proteine der Fall ist, und daß es auf diese Weise zu einer länger dauernden Erhöhung der Aminosäuren im Blute und damit zu der Möglichkeit umfangreicherer Verluste kommen würde. Bausteine, die beseitigt werden *müßten*, weil sei für den Organismus nicht wenigstens als Brennstoff verwendbar waren, kennen wir freilich auch in den geringwertigen Eiweißkörpern nicht. *Folin* und *Berglund* sowie *Nonnenbruch* und *Gottschalk* haben im wesentlichen mit Casein, die amerikanischen Autoren daneben auch mit der sehr geringwertigen Gelatine gearbeitet, die denn auch die Aminosäureausscheidung besonders ausgiebig steigerte. Wir legten uns die Frage vor, ob sich bei der Verwendung einer Reihe von Proteinen aller Stufen der Wertigkeitsskala greifbare Unterschiede herausstellen würden.

Die Untersuchungen wurden im Rahmen eines Selbstversuchs an dem einen von uns (*Siwon*) ausgeführt. Da sie sich mit kleinen Unterbrechungen über mehrere Monate hinzogen, war es nicht möglich, einen strengen Stoffwechselversuch durchzuführen. Wir kontrollierten aber während eines mehrtägigen Aufenthalts in der medizinischen Klinik, daß die Versuchsperson im Ablauf ihres Eiweißstoffwechsels keine Besonderheiten darbot. Während dieser Zeit wurden die Analysen im Laboratorium der Klinik ausgeführt, und wir möchten dem Oberarzt der Klinik, Herrn Prof. Dr. *E. Frank*, auch an dieser Stelle für sein großes Entgegenkommen danken. Während der ganzen Dauer des eigentlichen Versuchs wurde die Assistentenkost der chirurgischen Universitätsklinik genossen, die eine ausreichende und vor allem ganz gleichmäßige Versorgung mit Eiweiß bot. Das Körpergewicht der Versuchsperson änderte sich in der ganzen Zeit bis auf geringe Schwankungen nicht.

Die Bestimmungen des Aminosäurestickstoffs im Harn nahmen wir in der ersten Zeit gleichzeitig nach dem gasometrischen Verfahren von *van Slyke*, durch Aminosäuretitration nach *Sörensen* und mittels des kolorimetrischen Verfahrens nach *Folin* vor[1]). Es stellte sich bald

[1]) *O. Folin*, Journ. of biol. Chem. **51**, 393, 1922.

heraus, daß dieses letzte Verfahren den anderen zweifellos überlegen war, worauf wir es ausschließlich verwendeten.

Wir fanden an den Tagen, an denen keine besonderen Maßnahmen getroffen waren, eine mittlere Ausscheidung von 220 mg Aminosäurestickstoff. Wie gleichmäßig die Aminosäureausscheidung unter einheitlichen Lebens- und Ernährungsbedingungen sein kann, zeigt z. B. ein Blick auf die Abb. 7, in der zwei Serien von Normaltagen, unterbrochen durch je einen ergebnislos verlaufenen Kochsalzversuch, wiedergegeben sind.

An den 3 Februartagen sind die Aminosäurestickstoffwerte 218, 220 und 212 mg in der Zeit vom 3. bis 10. Mai 1924, die Grenzwerte 218 und 240 mg. Natürlich darf man aber mit einer Konstanz der Ausscheidung in derart engen Grenzen nicht bestimmt rechnen. Wir haben deshalb als Steigerungen der Aminosäureausfuhr nur diejenigen Erhebungen gebucht, die sich über den Vor- und Nachtag wesentlich heraushoben.

Bei der Betrachtung unserer Versuchsergebnisse stellen wir aus äußeren Gründen die Eiweißzulageversuche voran. Wir verwendeten bei diesen Casein in Form von Weißkäse, Kabeljau, Erbsen und Weizenprotein. Nach der Tabelle von *Thomas* ist die biologische Wertigkeit des Kabeljaufleisches 92 Proz., die des Caseins 70 Proz., des Erbsen- und Weizeneiweißes 55 bzw. 36 Proz. Wir bedienten uns der Naturprodukte, nicht reiner Eiweißpräparate des Handels, wie das auch *Thomas* getan hat. Unsere Absicht, durch Eingabe von je 10 g N in Form der verschiedenen Proteine die Eiweißzufuhr ungefähr zu verdoppeln, ließ sich nur im Fall des Caseins genau verwirklichen. Bei den anderen Stoffen, insbesondere bei dem Weizenmehl, das als Einback genossen wurde, erwies sich die Aufnahme so großer Stickstoffmengen in einer Mahlzeit als unmöglich. Die Aufnahme der Versuchsmahlzeit erfolgte in der Regel um 10 Uhr vormittags. Der Harn wurde in zwei Portionen von morgens 8 bis abends 8 Uhr und von dort bis 8 Uhr am folgenden Morgen gesammelt. Die Untersuchung erfolgte getrennt (siehe die Tabellen am Schluß), unsere Diagramme verzeichnen jedoch die durch Addition gewonnenen 24 Stundenwerte.

In der nachstehenden Abb. 1 sind die Ergebnisse unserer Eiweißversuche wiedergegeben. Die dunklen Zylinder bezeichnen die Aminosäureausscheidung in Milligrammen, die hellen die Wasserausscheidung, die in diesen Versuchen nicht planmäßig beeinflußt wurde, aber natürlich einige Schwankungen nach beiden Seiten des Mittels zeigt. Jeder Versuchstag erscheint mit seinem Vor- und Nachtag. Im übrigen wurden nicht etwa alle Eiweißversuche hintereinander ausgeführt, sondern sie verteilen sich, wie die beigegebenen Daten zeigen, auf den größten Teil der gesamten Untersuchungszeit.

Eine erhebliche Störung zeigte sich nur an dem ersten Erbsentag, an dem die Resorption durch eine leichte Diarrhöe gestört war. Es kommt das auch in der niedrigen Wasserausscheidung dieses Tages zum Ausdruck. Bei diesem Versuche vermissen wir eine Einwirkung der Eiweißzulage auf die Aminosäureausscheidung, in allen anderen Versuchen trat eine solche aber unverkennbar hervor. Die Ausschläge sind nicht besonders groß, insbesondere viel kleiner als die von *Nonnenbruch* und *Gottschalk* bei rektaler Zufuhr erzielten, aber in jedem Falle durch den Vergleich mit Vor- und Nachtag sicher feststellbar. Die absoluten Zunahmen gegenüber dem Mittel von Vor- und Nachtag

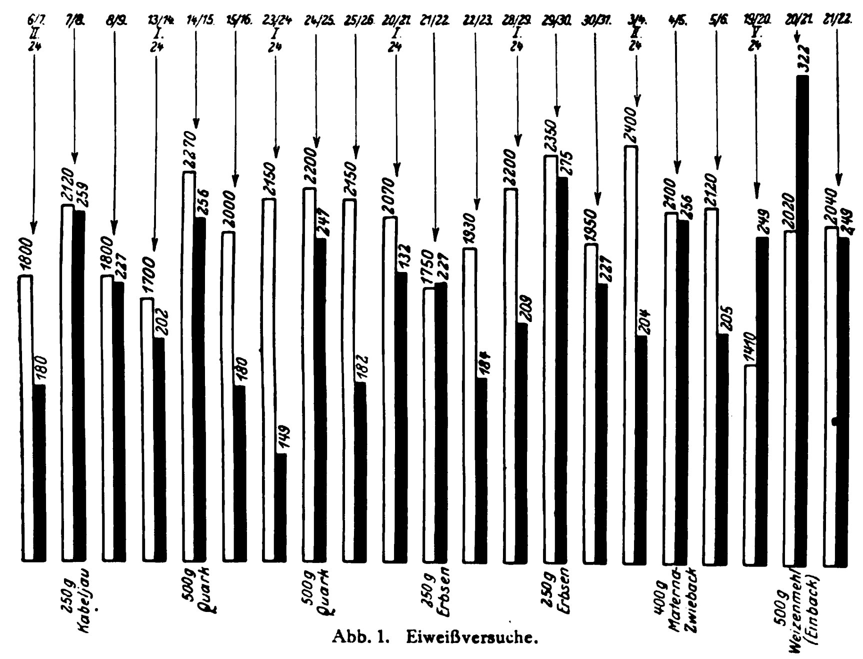


Abb. 1. Eiweißversuche.

sind bei Weißkäse 65 und 62 mg, bei Erbsen 57 mg, Kabeljau 56 mg, Materna 52 mg und Weizenmehl 72 mg. Erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinen oder gar ein Parallelismus zu ihrer Stellung auf der Skala der biologischen Wertigkeit ergeben sich aus diesen Zahlen nicht. Das Bild wird aber etwas anders und die Unterschiede deutlicher, wenn man die verschiedene Menge der aufgenommenen Eiweißkörper berücksichtigt, indem man sie in jene Zahlen dividiert. So ergibt sich

für 1 g Casein-N eine Steigerung von 6,1 bzw. 8,1 mg
„ 1 g Kabeljau-N „ „ „ 6,6 mg
„ 1 g Materna-N „ „ „ 7,2 „
„ 1 g Erbsen-N „ „ „ 7,9 „
„ 1 g Weizenprotein-N „ „ „ 13,7 „

Es hebt sich also wenigstens das Weizenprotein deutlich aus der Reihe der anderen heraus, die ihrerseits nahe aneinanderliegen. Auch bringt es als einziges Eiweiß eine Erhöhung des prozentischen Anteils des Aminosäurestickstoffs am Gesamtstickstoff hervor. Es erscheint danach unwahrscheinlich, daß bei der gewöhnlichen gemischten Kost große Schwankungen der Aminosäureausfuhr durch die Qualität der aufgenommenen Eiweißstoffe hervorgerufen werden. Bei einseitiger Ernährung mit Zufuhr von hauptsächlich vegetabilischem Eiweiß könnten aber vor allem im Verlauf längerer Perioden Mehrverluste an Aminosäuren eintreten, die ins Gewicht fielen.

Abb. 2. Wasserversuche.

Aus der Gesamtheit der Versuche gewinnt man den Eindruck, daß die endogene Komponente der Aminosäureausscheidung zum mindesten von der gleichen Größenordnung ist, wie die durch die Nahrung bedingte Erhöhung. Diese endogene Komponente resultiert aus den Beziehungen der Niere zu dem Aminosäurespiegel des normalen Nüchternblutes, der nach *Folins* Bestimmungen nicht unter 5 mg-Proz. Stickstoff sinkt.

Wir haben nun auf dieses Verhältnis einzuwirken versucht, indem wir die Niere in verschiedener Weise zu größeren Arbeitsleistungen zwangen. Die einfachste und nächstliegende Möglichkeit war die Steigerung der Diurese durch Verabreichung größerer Flüssigkeitsmengen. Abb. 2 gibt eine Übersicht über zwei Versuche, in deren erstem (am 29. April) 1 Liter, in deren zweitem (am 24. Juni) 2 Liter Wasser außer der gewöhnlichen Flüssigkeitsaufnahme getrunken wurden. Die erste Menge wurde innerhalb einer, die zweite innerhalb von zwei Stunden getrunken. Am ersten Tage stieg die Harnmenge auf 2450 ccm zwischen 1300 und 2200 ccm des Vor- und Nachtages, die Aminosäureausscheidung auf 291 mg zwischen 213 und 216 mg. Am zweiten Versuchstage betrug die Harnmenge 4180 ccm zwischen 2050 und 1200 ccm, die der Aminosäuren 362 mg zwischen 228 und 232 mg. In beiden Fällen ist die Steigerung der Aminosäureausfuhr sehr deutlich und durch das größere Flüssigkeitsvolumen viel energischer gesteigert als durch das kleinere. Am Nachtag des zweiten Versuchs

war die Harnmenge besonders klein. Daran mag zum Teil die heiße Witterung schuld sein, die an diesem Tage auf eine längere Regenperiode folgte. Prozentisch beträgt die Steigerung im ersten Versuch 33, im zweiten 59,7 Proz. über das Mittel des Vor- und Nachtages hinaus.

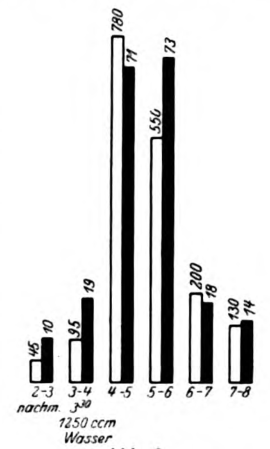


Abb. 3.
Stundenversuche mit Wasser.

In einem weiteren Versuch prüften wir den Einfluß ausgiebiger Wasserdarreichung in kürzeren Zeitabschnitten. Nachdem eine Stundenportion des Harns von 45 ccm mit 10 mg Aminosäurestickstoff gesammelt war, wurden 1250 ccm Wasser getrunken. Die Aufnahme war am Ende der zweiten Stunde abgeschlossen. In ihr wurden 95 ccm Harn mit 19 mg Aminosäurestickstoff ausgeschieden. Die beiden folgenden Stundenportionen hatten Volumina von 780 und 550 ccm, die Aminosäuremengen betrugen 71 und 75 mg. Dann sanken beide Größen steil ab. In den beiden nächsten Stunden betrug die Harnmenge 200 und 130 ccm, die des Aminosäurestickstoffs 18 bzw. 14 mg (Abb. 3).

Wir untersuchten auf Grund dieser Befunde die Ergebnisse aller anderen Versuchstage auf Zusammenhänge zwischen der Harnmenge, die bei der Versuchsperson ziemlich starken Schwankungen unterlag, und den Betrag der Aminosäureausscheidung. Es sind mehrere Perioden in unserer Versuchsreihe vorhanden, in denen man durchaus den Eindruck gewinnt, daß ein Parallelismus beider Größen vorhanden ist. Die Zahlen für die Wasser- und Aminosäureausscheidung in der ersten Woche unseres Versuchs unter Weglassung des ersten Caseintages (Abb. 4) ergeben z. B. folgendes Bild:

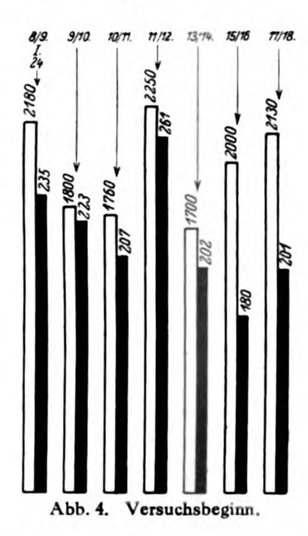


Abb. 4. Versuchsbeginn.

Datum	Harnmenge	Aminosäure-N	Datum	Harnmenge	Aminosäure-N
8./9. I.	2180	235 mg	12./13. I.	Caseintag	
9./10. I.	1800	223 „	13./14. I.	1700	202 mg
10./11. I.	1760	207 „	15./16. I.	2000	180 „
11./12. I.	2250	261 „	16./17. I.	2150	201 „

Es hebt sich also wenigstens das Weizenprotein deutlich aus der Reihe der anderen heraus, die ihrerseits nahe aneinanderliegen. Auch bringt es als einziges Eiweiß eine Erhöhung des prozentischen Anteils des Aminosäurestickstoffs am Gesamtstickstoff hervor. Es erscheint danach unwahrscheinlich, daß bei der gewöhnlichen gemischten Kost große Schwankungen der Aminosäureausfuhr durch die Qualität der aufgenommenen Eiweißstoffe hervorgerufen werden. Bei einseitiger Ernährung mit Zufuhr von hauptsächlich vegetabilischem Eiweiß könnten aber vor allem im Verlauf längerer Perioden Mehrverluste an Aminosäuren eintreten, die ins Gewicht fielen.

Aus der Gesamtheit der Versuche gewinnt man den Eindruck, daß die endogene Komponente der Aminosäureausscheidung zum mindesten von der gleichen Größenordnung ist, wie die durch die Nahrung bedingte Erhöhung. Diese endogene Komponente resultiert aus den Beziehungen der Niere zu dem Aminosäurespiegel des normalen Nüchternblutes, der nach *Folins* Bestimmungen nicht unter 5 mg-Proz. Stickstoff sinkt.

Wir haben nun auf dieses Verhältnis einzuwirken versucht, indem wir die Niere in verschiedener Weise zu größeren Arbeitsleistungen zwangen. Die einfachste und nächstliegende Möglichkeit war die Steigerung der Diurese durch Verabreichung größerer Flüssigkeitsmengen. Abb. 2 gibt eine Übersicht über zwei Versuche, in deren erstem (am 29. April) 1 Liter, in deren zweitem (am 24. Juni) 2 Liter Wasser außer der gewöhnlichen Flüssigkeitsaufnahme getrunken wurden. Die erste Menge wurde innerhalb einer, die zweite innerhalb von zwei Stunden getrunken. Am ersten Tage stieg die Harnmenge auf 2450 ccm zwischen 1300 und 2200 ccm des Vor- und Nachtages, die Aminosäureausscheidung auf 291 mg zwischen 213 und 216 mg. Am zweiten Versuchstage betrug die Harnmenge 4180 ccm zwischen 2050 und 1200 ccm, die der Aminosäuren 362 mg zwischen 228 und 232 mg. In beiden Fällen ist die Steigerung der Aminosäureausfuhr sehr deutlich und durch das größere Flüssigkeitsvolumen viel energischer gesteigert als durch das kleinere. Am Nachtag des zweiten Versuchs

Abb. 2. Wasserversuche.

war die Harnmenge besonders klein. Daran mag zum Teil die heiße Witterung schuld sein, die an diesem Tage auf eine längere Regenperiode folgte. Prozentisch beträgt die Steigerung im ersten Versuch 33, im zweiten 59,7 Proz. über das Mittel des Vor- und Nachtages hinaus.

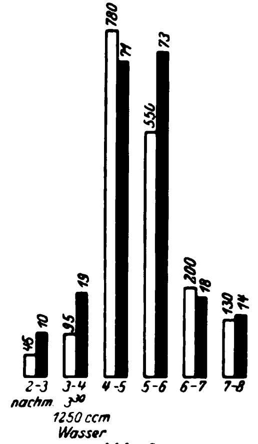
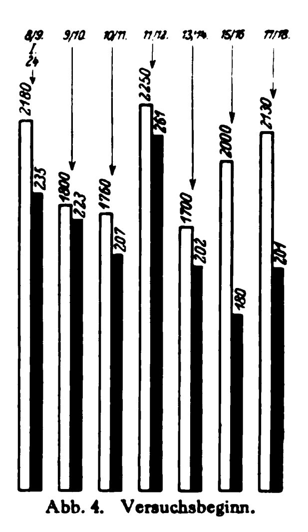


Abb. 3. Stundenversuche mit Wasser.

In einem weiteren Versuch prüften wir den Einfluß ausgiebiger Wasserdarreichung in kürzeren Zeitabschnitten. Nachdem eine Stundenportion des Harns von 45 ccm mit 10 mg Aminosäurestickstoff gesammelt war, wurden 1250 ccm Wasser getrunken. Die Aufnahme war am Ende der zweiten Stunde abgeschlossen. In ihr wurden 95 ccm Harn mit 19 mg Aminosäurestickstoff ausgeschieden. Die beiden folgenden Stundenportionen hatten Volumina von 780 und 550 ccm, die Aminosäuremengen betrugen 71 und 75 mg. Dann sanken beide Größen steil ab. In den beiden nächsten Stunden betrug die Harnmenge 200 und 130 ccm, die des Aminosäurestickstoffs 18 bzw. 14 mg (Abb. 3).


Abb. 4. Versuchsbeginn.

Wir untersuchten auf Grund dieser Befunde die Ergebnisse aller anderen Versuchstage auf Zusammenhänge zwischen der Harnmenge, die bei der Versuchsperson ziemlich starken Schwankungen unterlag, und den Betrag der Aminosäureausscheidung. Es sind mehrere Perioden in unserer Versuchsreihe vorhanden, in denen man durchaus den Eindruck gewinnt, daß ein Parallelismus beider Größen vorhanden ist. Die Zahlen für die Wasser- und Aminosäureausscheidung in der ersten Woche unseres Versuchs unter Weglassung des ersten Caseintages (Abb. 4) ergeben z. B. folgendes Bild:

Datum	Harnmenge	Aminosäure-N	Datum	Harnmenge	Aminosäure-N
8./9. I.	2180	235 mg	12./13. I.	Caseintag	
9./10. I.	1800	223 „	13./14. I.	1700	202 mg
10./11. I.	1760	207 „	15./16. I.	2000	180 „
11./12. I.	2250	261 „	16./17. I.	2150	201 „

Mit alleiniger Ausnahme des Tages (15./16. Januar) gehen in dieser Zeit Wasser- und Aminosäureausscheidung gleichsinnig, verschiedentlich wird sogar eine gewisse Proportionalität beider Größen erkennbar. Jedenfalls gewinnt man den Eindruck, daß die Ausscheidung der Aminosäuren mit der des Wassers verknüpft ist.

Wir suchten dann weiter die Arbeit der Niere durch Vermehrung der auszuscheidenden festen Stoffe und auf pharmakologischem Wege zu steigern. Zu diesem letzten Zwecke bedienten wir uns des Theocins.

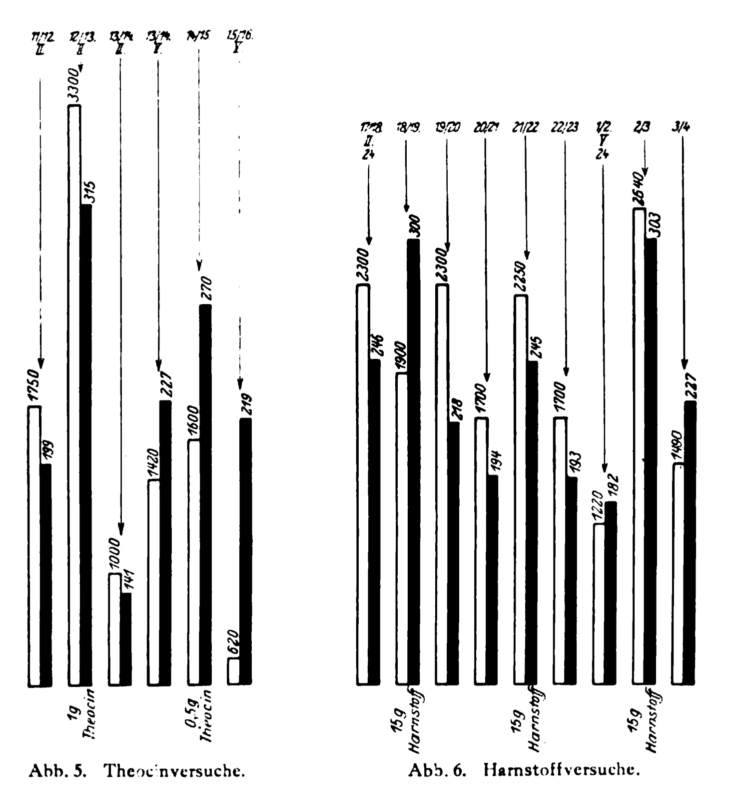


Abb. 5. Theocinversuche. Abb. 6. Harnstoffversuche.

Bekanntlich hat man früher die Wirkung der Diuretica der Xanthingruppe so interpretiert, daß sie einen elektiven Reiz auf die Wände der Nierengefäße ausübten[1]). Neuerdings hat *Ellinger* dargetan, daß sie entquellend auf die Kolloide des Organismus wirken, so daß die Diurese als Folge einer endogenen Plasmaverwässerung erscheint[2]). In beiden Fällen besaßen Versuche mit einem derartigen Mittel Interesse,

[1]) *Fletcher*, *Henderson* und *Löwi*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **53**, 15, 1905.

[2]) *A. Ellinger*, *Heymann* und *Klein*, ebendaselbst **91**, 1, 1921.

wenn auch im zweiten nur eine Bestätigung unserer Wasserversuche zu erwarten war.

Am 12. Februar nahm die Versuchsperson 1 g Theocin, also eine sehr hohe Dosis, die denn auch die Harnabsonderung von 1750 auf 3300 ccm steigerte. Die Aminosäureausscheidung stieg von 199 mg am Vortage auf 315 mg am Vesuchstage. Der Nachtag brachte abnorm kleine Harn- und Aminosäuremengen (1000 ccm, 141 mg). Gegenüber dem Vortage beträgt die Steigerung des Aminosäurestickstoffs 58 Proz., also genau soviel, wie bei Verabreichung von 2 Liter Wasser. Besonders interessant waren die Ergebnisse des zweiten Theocinversuchs, der am 14. Mai unternommen wurde. Da sich bei der ersten starken Theocingabe verschiedene erhebliche Beschwerden ergeben hatten, wollten wir sie nicht wiederholen und gaben nur 0,5 g. Da auch dieser Versuch bei sehr warmer Witterung unternommen wurde, erzielten wir nur eine geringe Steigerung des Harnvolumens von 1420 auf 1600 ccm und sahen am Nachtage sogar eine abnorm kleine Menge eines höchst konzentrierten Harns von der Dichte 1034. Die Aminosäuren gingen denn auch nur mäßig, um 43 mg oder 18 Proz. in die Höhe. Auch hier zeigen sich also die Aminosäuren in ihrer Ausscheidung an das Wasser gebunden (Abb. 5).

Mit Harnstoff wurden drei Versuche angestellt (Abb. 6). In den beiden ersten wurden um 1 und 5 Uhr je 7,5 g in wässeriger Lösung genommen. Die Ausscheidung desselben vollzog sich wesentlich langsamer als die des Wassers, war aber am Morgen des Nachtages zum größten Teil abgeschlossen. In dem ersten Versuch am 18./19. Februar blieb die erwartete Diurese aus, es wurde ein ziemlich hochgestellter Harn ausgeschieden. Die 1000 ccm Tagesharn (Durchschnitt 1022) und 900 ccm Nachtharn (Durchschnitt 1024) enthielten je 150, zusammen 300 mg Aminosäurestickstoff, d. i. ein Überschuß von 27 Proz. über das Mittel von Vor- und Nachtag hinaus. Im zweiten Versuch am 21./22. Februar war die Harnstoffdiurese deutlich. Es wurden 2250 ccm Harn mit 245 mg Aminosäurestickstoff ausgeschieden, was gegenüber jenem Mittel eine Steigerung um 21 Proz. bedeutet.

Diese beiden Versuche ergeben kein ganz übereinstimmendes Bild. Während in dem zweiten die Steigerung der Aminosäureausscheidung sich durch die Zunahme der Diurese ausreichend erklären ließe, ist in dem ersten eine Vermehrung eingetreten, ohne daß die Harnflut gewachsen wäre. Man könnte danach versucht sein anzunehmen, daß der Harnstoff die Aminosäureausfuhr auch direkt, ohne den Umweg über eine Diuresesteigerung, fördern könnte. (Daß eine Steigerung des Harnstoffgehalts an sich auf das Ergebnis der Aminosäurebestimmung nach *Folin* ohne Einfluß ist, haben wir noch besonders kontrolliert, indem wir einen Harn einmal sofort, daneben unter Verdoppelung des

Harnstoffgehalts untersuchten. Die Ergebnisse waren beide Male die gleichen.)

Wir versuchten, über das Verhalten des Harnstoffs genaueren Aufschluß zu gewinnen, indem wir an einem Tage 15 g Harnstoff in zwei Portionen gaben und den Harn in Perioden von 2½ Stunden Dauer sammelten. Es ergab sich folgendes Bild:

Harnstoffversuch vom 2./3. Mai.
Um 11 Uhr 10 g, um 1 Uhr 5 g Harnstoff per os.

Zeit	Harnmenge ccm	Spez. Gew.	Gesamt-N g	Harnstoff-N g	Aminosäure-N mg
8h00′—10h30′	110	1026	1,31	1,05	16
10 30 — 1 00	230	1017	2,03	1,61	24
1 00 — 3 30	225	1017	2,34	2,14	24
3 30 — 6 00	175	1025	2,38	1,96	36
6 00 — 8 00	600	1012	2,34	1,95	63
8 00 — 8 00	1300	1017	8,06	7,88	141
	2640	—	18,46	16,59	304

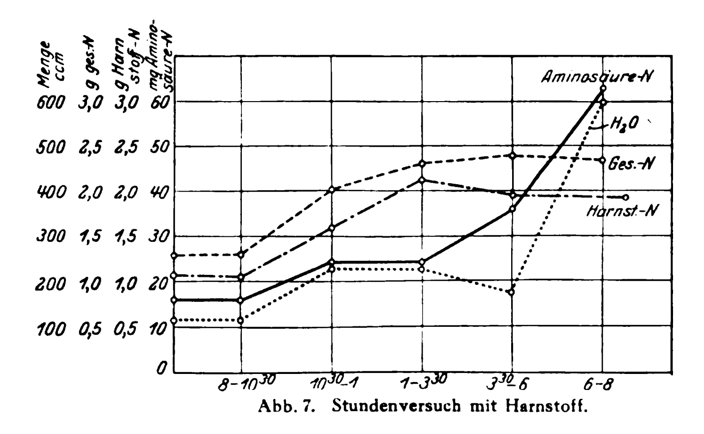


Abb. 7. Stundenversuch mit Harnstoff.

Hier macht sich von 1 Uhr an eine Steigerung der Harnstoffausscheidung bemerkbar, die bis zum Abend annähernd auf gleicher Höhe bleibt. Der Aminosäurestickstoff ist schon in der Zeit von 3 Uhr 30 Minuten bis 6 Uhr stark gesteigert. Die gleiche Bewegung findet sich auch an Normaltagen um diese Zeit, sie dürfte daher mit der Eiweißaufnahme bei der Hauptmahlzeit zusammenhängen. Eine besonders energische Steigerung erfolgt in der Zeit von 6 bis 8 Uhr zugleich mit einer solchen der Diurese. Der Nachtharn enthält von der Tagesmenge des Wassers 49, von der des Harnstoffs 47 und von der des Aminosäurestickstoffs 46 Proz., gestattet also keinerlei Schlüsse. Ein direkter Einfluß der Harnstoffausscheidung wird in diesem Versuch nicht erkennbar.

Zwei Kochsalzversuche, in denen je 10 g des Salzes in Wasser gelöst auf einmal genommen wurden, gaben übereinstimmend ein völlig negatives Resultat. Die Kochsalzmenge wurde innerhalb des Versuchstages ausgeschieden, wobei nur das eine Mal eine einigermaßen ausgiebige Steigerung der Harnmenge eintrat, ohne daß es zu einer Zunahme der Aminosäuremenge im Harn gekommen wäre (Abb. 8).

Es scheint danach, daß Kochsalz und Harnstoff sich etwas verschieden verhalten. Es mag das in dem verschiedenen Schicksal begründet sein, das beide Stoffe auf dem Wege durch die Niere erfahren. Das in den Glomerulis austretende Kochsalz wird in den Tubulis zum Teil zurückresorbiert, während die Menge des Harnstoffs in diesen durch Sekretion vermehrt wird, ohne daß eine Rückresorption erfolgte. Wir kennen auch sonst verschiedene Unterschiede in dem Verhalten der beiden Stoffe der Niere gegenüber. So ist die Harnstoff-, nicht aber die Kochsalzdiurese, von einer Zunahme des Sauerstoffverbrauchs der Niere begleitet[1]) und beide sind verschieden in ihrer Empfindlichkeit gegenüber der Sublimatvergiftung.

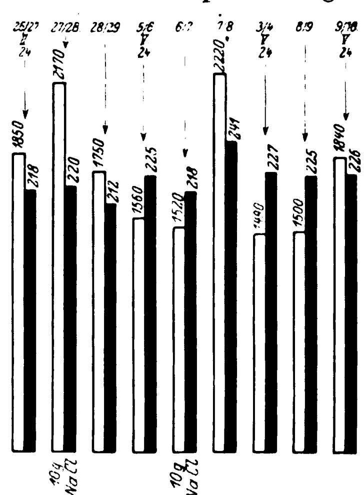


Abb. 8. Kochsalzversuche.

Wir möchten das Ergebnis unserer Versuche dahin zusammenfassen, daß der durch die Nahrung bedingte Anteil der Aminosäureausscheidung hinter dem endogenen an Umfang zurücksteht, daß zwar beide getrennt durch geeignete Maßnahmen zu beeinflussen sind, aber wieder der endogene wirksamer. Die Größe des endogenen Anteils hängt augenscheinlich zum Teil auch von den speziellen Verhältnissen in der Niere ab, da es gelang, ihn durch Maßnahmen zu steigern, die den Aminosäuregehalt des Blutes nicht ändern können. Allen gemeinsam ist die Durchfuhr vergrößerter Wassermengen durch die Glomeruli. Es wurden schon oben die Versuche von *Goebel* erwähnt, in denen Säuglingen die gleiche Nahrung, also auch die gleiche Eiweißmenge, zugleich mit verschiedenen Wassermengen gegeben wurde. Bei den Kindern, die an sich schon eine abnorm hohe Aminosäureausscheidung besaßen, zeigte sich eine sehr deutliche, bei solchen mit an sich normaler Aminosäureausscheidung eine weniger ausgeprägte Erhöhung des Verhältnisses Aminosäurestickstoff : Gesamtstickstoff im Harn. Die absoluten

[1]) *J. Barcroft* und *H. Straub*, Journ. of Physiol. **41**, 145, 1912.

Mengen beider Größen wurden wegen der bekannten Schwierigkeiten im quantitativen Aufsammeln des Harns bei Säuglingen nicht gemessen, würden aber ohne Zweifel ein nicht sehr abweichendes Resultat gegeben haben. Auch *Goebel* sicht die Ursache der von ihm beobachteten Erscheinung im Verhalten der Niere und speziell darin, daß die Niere des Säuglings und in noch höherem Grade die des unausgereiften Kindes die Anforderungen der hohen Wasserausscheidung nicht zu erfüllen vermag, ohne für andere Blutbestandteile durchlässiger zu werden. Unsere Versuche zeigen darüber hinaus, daß hier nicht etwa eine sich später ausgleichende Unvollkommenheit der Säuglingsniere vorliegt, sondern daß vielmehr auch die Niere des Erwachsenen eine Steigerung der Diurese durch Maßnahmen verschiedenster Art mit einer Erhöhung der Aminosäureausfuhr begleitet. Die Erkenntnis, daß die Aminosäuren mit dem Wasser gehen, bringt zugleich die Entscheidung der Frage, die wir uns vorgelegt hatten: ob nämlich die Höhe der Aminosäureausfuhr mit dem Betrag der der Niere zugemuteten Arbeit in Zusammenhang stünde. Wenn nämlich die Aminosäuren das Wasser begleiten, mit erhöhtem Wasserzustrom also auch in vermehrter Menge in die Niere gelangen, so ergibt sich die Möglichkeit, die vermehrte Ausscheidung auf das verstärkte Angebot zu beziehen, und sie wird zur Notwendigkeit angesichts des Fehlens einer Steigerung durch andere Formen der Nierenarbeit. Zugleich mit den Aminosäuren strömt nun bei einer Verstärkung der Diurese z. B. auch der Zucker den Nieren in vermehrter Menge zu, ohne daß es zu einer Ausscheidung kommt, und wir müssen in dem Verhalten der Niere zu den einmal zu ihr gelangten Aminosäuren einen besonderen Faktor suchen, der veranlaßt, daß die mehr aufgenommenen Aminosäuren zum Teil in den Harnwegen verbleiben.

Alle Theorien über die Harnbildung gehen von der Annahme des Übertritts einer Flüssigkeit, die alle kristalloiden Plasmabestandteile, aber kein Eiweiß enthält, aus den Schlingen der Glomeruli in den *Bowman*schen Kapselraum aus. Ein Unterschied besteht nur insofern, als von der einen Seite eine Filtration oder besser Ultrafiltration, von der anderen eine Sekretion des Primärharns angenommen wird. Dieser Flüssigkeit werden auf dem Wege durch die Tubuli durch deren Epithelzellen einige Bestandteile, wie Wasser, Kochsalz und Traubenzucker, ganz oder teilweise wieder entzogen, während andere, wie Harnstoff und Harnsäure, ihr durch Sekretion zugefügt werden.

Bezüglich der im Glomerulus stattfindenden Vorgänge haben neue Untersuchungen von *Starling* und *Verney*[1]) starke Gründe, wohl die Entscheidung zugunsten der Filtrationstheorie gebracht. *Starling* und

[1]) *E. H. Starling* und *E. B. Verney*, Arch. d. Physiol. **205**, 47, 1924.

Verney argumentierten so, daß die Arbeitsleistung einer Filtration vom Herzen, die einer Sekretion von der Niere bestritten werden müsse. Alle Sekretionsvorgänge müssen demnach stocken, wenn man die Niere durch Blausäurevergiftung verhindert, aus Oxydationsvorgängen Energie zu gewinnen, wie sie das bei ihrer normalen Arbeitsleistung in größtem Umfang tut[1]). Filtrationsvorgänge dagegen müssen unter diesen Umständen ungehindert weitergehen können. Tatsächlich wurde nun in Durchströmungsversuchen am *Starling*schen Herz-Nierenpräparat bei Blausäurevergiftung ein Weitergehen der Harnbildung gesehen, der Harn war aber kochsalzreicher und harnstoffärmer als der unter normalen Bedingungen abgesonderte. Die Absonderung des Wassers, des Kochsalzes und eines Teiles des Harnstoffs erscheinen danach als Filtrationsvorgang, die Arbeit der Niere erstreckt sich nur auf die Rückresorption eines Teiles der Chloride und die Sekretion weiterer Harnstoffmengen.

Die Aminosäuren gelangen mit dem Wasser und den anderen Plasmakristalloiden, vor allem der Glucose, in die Nierenkanälchen hinein. Über ihre absolute Menge im Primärharn und über die Veränderungen, die bei der Passage durch die Tubuli in seinem Aminosäuregehalt vorgehen, können wir uns keine genaue Vorstellung machen. (Ein Anhalt könnte vielleicht mit Hilfe der *Starling*schen Versuchsanordnung gewonnen werden.) Seine obere Grenze können wir aber schätzen, wenn wir von der mittleren Tagesproduktion an Harnstoff und von dem Verhältnis von Harnstoff- und Aminosäurestickstoff im Blutplasma ausgehen. Die Tagesmenge des Harnstoffstickstoffs mag mit etwa 15 g angesetzt werden, im Plasma beträgt die Menge des Aminosäurestickstoffs ungefähr ein Drittel vom Harnstoffstickstoff. Falls der ganze Harnstoff in den Glomerulis ausgeschieden würde, hätten wir mit dem Auftreten von etwa 5 g Aminosäurestickstoff in dem in 24 Stunden sezernierten Primärharn zu rechnen. In Wirklichkeit wird es in dem Maße weniger sein, als Harnstoff in den Tubulis sezerniert wird, sicher aber ein erheblicher Bruchteil dieser Menge. Vergleichen wir nun damit die tatsächlich in den Harn gelangende Menge, so ergibt sich, daß die Niere einen Teil, wahrscheinlich die Hauptmenge, der in die Tubuli gelangenden Aminosäuren wieder aufsaugt. Dies ist derselbe Mechanismus, durch den im gesunden, nicht mit Traubenzucker überschwemmten Organismus der Traubenzucker erhalten bleibt. Für die Froschniere hat *Clark*[2]), für die Säugerniere *Nishi*[3]) unter *H. H. Meyer* festgestellt, daß Zucker im Glomerulus ausgeschieden, in den Tubulis aber, und zwar unter normalen Umständen quantitativ,

---

[1]) *Barcroft* und *Straub*, l. c.
[2]) *Clark*, Glucose absorption in the renal tuberles of the frog. 1922.
[3]) *Nishi*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **62**, 329. 1910.

wieder aufgesaugt wird. Die Niere verhält sich den Aminosäuren gegenüber ähnlich, wie gegen den Traubenzucker, arbeitet aber nicht, wie in jenem Falle, quantitativ.

Mit den Ursachen des verschiedenen Verhaltens der Nierenepithelien gegenüber den einzelnen kristalloiden Harnbestandteilen hat sich in neuerer Zeit vor allem *Cushny* beschäftigt. Er hat zuerst[1]) versucht, physikalisch-chemische Momente, vor allem das ungleiche Diffusionsvermögen der gelösten Stoffe für ihr verschiedenes Verhalten verantwortlich zu machen. Diese Erklärung läßt jedoch schon bei den Zuckern vollständig im Stich. Die Niere ist dicht nur gegen Traubenzucker, die Disaccharide läßt sie vollständig, Pentosen und sogar die Hexose Galaktose zum Teil durch. Hier sind irgendwie beträchtliche Unterschiede im physikalisch-chemischen Verhalten gegenüber der Glucose nicht vorhanden und *Cushny* hat denn auch in seinem 1917 erschienenen Buche The secretion of urine[2]) die physikalisch-chemische Theorie verlassen und eine physiologische an ihre Stelle gesetzt. Er unterscheidet zwischen dem Verhalten der Schwellen- und Nichtschwellensubstanzen des Blutes. Die ersteren, zu denen Kochsalz, Zucker und auch das Wasser gehören, werden von den Epithelzellen zurückresorbiert, und zwar in Gestalt einer isotonischen Lösung, in der auch alle Partiardrucke gleich denen des Plasmas sind. Die Nichtschwellensubstanzen dagegen, zu denen die eigentlichen Exkretstoffe und die körperfremden Substanzen gehören, werden nicht resorbiert. Die Einstellung auf die Aufnahme ganz bestimmter Substanzen, die schon bei den Darmepithelien vorhanden ist, ist also bei denen der Tubuli bis zu der Schärfe eines Ferments gesteigert, so daß zwischen den nur stereochemisch unterschiedenen Zuckern unterschieden und die Glucose anders behandelt wird, als alle übrigen.

Mit dem Verhalten der Zucker müssen wir nun das der Aminosäuren vergleichen. Von ihnen ist die ziemlich große Anzahl von etwa 20 als Bestandteile des Eiweißmoleküls bekannt, die meisten von ihnen werden in jeder Eiweißart in größerer oder geringerer Menge angetroffen. Im Primärharn müssen wir jedenfalls mit der Gegenwart aller rechnen, da im Blutplasma bei *Abderhaldens* Untersuchungen[3]) keiner der bekannteren Eiweißbausteine vermißt wurde. Allen gemeinsam ist das Vorhandensein einer Carbonsäure- und einer Aminogruppe, die an ein und demselben Kohlenstoffatom stehen. Nur das Pyrrolidinderivat Prolin bildet hier eine Ausnahme. Im übrigen Teile des Aminosäuremoleküls nun finden wir aber Ausschnitte aus der ganzen organi-

[1]) *Cushny*, Journ. of Physiol. **27**, 429, 1901.
[2]) *Cushny*, London 1917.
[3]) *E. Abderhalden* und *Weil*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 478, 1913; **114**, 250, 1921.

Versuchsprotokolle.

Datum 1924	Harnmenge Tag ccm	Harnmenge Nacht ccm	Harnmenge Gesamt ccm	Dichte Tag	Dichte Nacht	Gesamtstickstoff Tag g	Gesamtstickstoff Nacht g	Gesamtstickstoff Gesamt g	Aminosäure-N Tag mg	Aminosäure-N Nacht mg	Aminosäure-N Gesamt mg	Bemerkungen
8./9. I.	820	1360	2180	1017	1009	5,07	8,66	14,23	84	151	235	
9./10. I.	—	—	1800	1015	1015	—	—	11,54	—	—	223	
10./11. I.	800	960	1760	1016	1019	4,83	6,55	11,38	98	109	217	
11./12. I.	1100	1150	2250	1012	1013	5,98	7,14	13,12	125	136	261	
13./14. I.	1100	600	1700	1013	1024	5,79	4,88	10,67	123	79	202	
14./15. I.	1370	900	2270	1025	1026	9,04	6,64	15,68	150	106	256	500 g Weißkäse = 10,7 g N
15./16. I.	1150	850	2000	1014	1019	6,08	4,52	10,60	105	75	180	
16./17. I.	1330	800	2130	1009	1018	4,74	4,18	8,92	108	93	201	
18./19. I.	800	600	1400	1018	1021	5,95	5,25	11,20	86	76	162	
20./21. I.	1300	770	2070	1009	1019	5,33	5,37	10,70	134	98	232	250 g Erbsen (roh gewogen)
21./22. I.	1800	950	1750	1014	1027	5,82	9,57	15,39	102	125	227	= 7,2 g N
22./23. I.	1200	730	1930	1010	1021	5,56	5,16	10,72	104	80	184	
23./24. I.	900	1150	2050	1015	1011	5,68	4,31	9,99	67	82	149	
24./25. I.	1200	1000	2200	1024	1021	9,53	7,40	16,93	144	103	247	500 g Weißkäse
25./26. I.	1050	1100	2150	1018	1017	6,88	6,93	13,81	89	92	182	
27./28. I.	700	640	1340	1026	1028	4,78	6,58	11,36	99	106	205	
28./29. I.	1000	1200	2200	1017	1015	6,35	5,63	11,98	103	105	208	
29./30. I.	1200	1150	2350	1015	1024	5,67	8,82	14,59	120	155	275	250 g Erbsen = 7,2 g N
30./31. I.	850	1100	1950	1016	1017	4,97	5,29	10,26	105	120	227	
31./1. II.	1500	800	2300	1012	1021	5,91	4,97	10,88	147	97	244	
1./2. II.	800	900	1700	1017	1016	5,52	5,55	10,07	110	121	231	
3./4. II.	1400	1000	2400	1009	1025	4,72	6,63	11,34	115	89	204	
4./5. II.	1100	1000	2100	1022	1015	8,05	6,27	14,32	149	106	255	400 g „Materna"-Zwieback
5./6. II.	1100	1020	2120	1016	1014	5,75	3,44	9,19	130	75	205	= 7,15 g N
6./7. II.	1000	800	1800	1017	1017	4,93	3,86	8,79	98	82	180	
7./8. II.	1260	860	2120	1013	1028	5,05	8,55	13,60	131	128	259	250 g Kabeljau = 8,4 g N
8./9. II.	960	1000	1960	1023	1017	7,83	7,18	14,01	139	144	283	Zweimal je 125 g Kabeljau
9./10. II.	1100	700	1800	1013	1021	6,16	5,51	11,67	123	104	227	
11./12. II.	900	850	1750	1019	1017	5,96	4,02	9,98	118	81	199	
12./13. II.	2300	1000	3300	1010	1015	6,95	4,87	11,82	230	85	315	1 g Theocin (11h und 4h je 0,5 g)
13./14. II.	550	450	1000	1020	1028	3,66	4,21	7,87	71	70	141	
14./15. II.	700	850	1550	1019	1022	4,61	6,39	11,00	92	122	214	
15./16. II.	1300	1000	2300	1011	1019	5,96	6,32	12,28	135	111	246	

Versuchsprotokolle (Fortsetzung).

Datum 1924	Harnmenge Tag ccm	Harnmenge Nacht ccm	Harnmenge Gesamt ccm	Dichte Tag	Dichte Nacht	Gesamtstickstoff Tag g	Gesamtstickstoff Nacht g	Gesamtstickstoff Gesamt g	Aminosäure-N Tag mg	Aminosäure-N Nacht mg	Aminosäure-N Gesamt mg	Bemerkungen
18./19. II.	1000	900	1900	1022	1024	8,37	9,68	18,05	150	150	300	15 g Harnstoff
19./20. II.	1000	1300	2300	1017	1016	7,05	6,33	13,38	79	121	200	
20./21. II.	900	800	1700	1015	1015	5,72	4,51	10,23	116	78	194	
21./22. II.	1100	1150	2250	1020	1016	7,94	8,02	15,96	141	104	245	ebenso
22./23. II.	800	900	1700	1016	1020	5,71	6,42	12,13	86	107	193	
25./26. II.	1000	1300	2300	1018	1015	6,16	4,77	10,93	129	101	230	
26./27. II.	900	950	1850	1021	1015	5,39	4,88	10,25	108	100	218	
27./28. II.	1320	850	2170	1013	1021	5,04	4,11	9,15	133	87	220	10 g NaCl
28./29. II.	900	850	1750	1015	1023	5,10	5,80	10,90	99	113	212	
28./29. IV.	600	700	1300	1027	1022	5,00	7,57	12,57	97	116	213	
29./30. IV.	1750	700	2450	1007	1022	5,48	7,48	12,96	181	110	291	10 bis 11½h 1 Liter Wasser
30./1. V.	1200	1000	2200	1022	1016	6,53	5,74	12,27	121	95	216	
1./2. V.	580	640	1220	1020	1030	4,08	6,95	11,03	69	113	182	
2./3. V.	1340	1300	2640	10	1017	10,40	8,06	18,46	163	140	303	15 g Harnstoff
3./4. V.	640	850	1490	1028	1024	7,95	7,41	15,36	104	123	227	
5./6. V.	1000	560	1560	1016	1027	4,38	4,96	9,34	133	92	225	
6./7. V.	900	620	1520	1021	1030	5,29	5,21	10,50	113	105	218	10 g NaCl[1])
7./8. V.	1440	780	2220	1011	1020	4,89	5,28	10,17	135	106	241	
8./9. V.	1000	500	1500	1019	1031	5,50	4,73	10,23	133	92	225	
9./10. V.	1420	420	1840	—	1026	6,59	4,23	10,82	143	83	226	
11./12. V.	1120	410	1530	1016	1029	6,82	5,08	11,90	171	75	246	
13./14. V.	900	520	1420	1020	1034	6,80	5,85	12,65	127	100	227	
14./15. V.	1040	560	1600	1015	1026	8,05	8,18	16,23	158	112	270	0,5 g Theocin
15./16. V.	320	300	620	1031	1034	4,75	4,39	9,14	114	105	219	
16./17. V.	640	400	1040	1031	1032	9,05	5,59	14,64	101	81	182	
19./20. V.	860	550	1410	1025	1026	6,75	5,02	11,77	161	88	249	
20./21. V.	920	1100	2020	1024	1016	8,69	4,79	13,48	159	163	322	500 g Weizenmehl als Einback = 5,7 g N
21./22. V.	1040	1000	2040	1016	1013	5,27	5,26	10,53	126	124	250	
23./24. V.	750	1300	2050	1025	1015	6,66	7,38	14,04	94	134	228	
24./25. V.	2680	1500	4180	1006	1010	7,26	5,67	12,93	212	150	362	3 bis 5h nachm. 2 Liter Wasser
25./26. V.	700	500	1200	1021	1032	6,40	7,00	13,40	128	104	232	

[1]) Chloridausscheidung:

	Tag	Nacht	Gesamt
5./5. IV.	11,41	9,50	20,91 g
6./7. IV.	15,48	14,43	29,91 g
7./8. IV.	12,72	8,29	21,01 g

schen Chemie wiedergespiegelt, insbesondere stoßen wir auf reaktionsfähige Gruppen der verschiedensten Art: Alkohol- und Sulfhydrylgruppen, Carboxyl- und Aminogruppen, Phenolhydroxyle usf. Es kommt hinzu, daß die Aminosäuren Ampholyte sind, die zwar bei der Reaktion des Wassers in ihrer typischen Gruppierung neutral reagieren, aber je nach der Reaktion des Milieus saure oder basische Eigenschaften entwickeln, H- oder OH-Ionen abdissoziieren können. Die schroffen Wechsel in der Ionenreaktion des Harns sind bekannt, und sie müssen von ebensolchen Veränderungen im Dissoziationszustand der Aminosäuren des werdenden Harns begleitet sein. Damit werden sich Unterschiede in der Hydratation und damit in der Größe der zu bewegenden Teilchen verbinden. Allen diesen Veränderungen ist der Traubenzucker als neutrale Substanz nicht unterworfen. Es ist deshalb sehr verführerisch, den Grund für das verschiedene Verhalten der Niere den Zuckern und den Aminosäuren gegenüber darin zu suchen, daß eine Anpassung an die mannigfaltige chemische Beschaffenheit und den ständig wechselnden physikalisch-chemischen Zustand dieser Stoffe nicht in dem Maße möglich ist, wie an die konstanten Eigenschaften der Zucker.

Insbesondere die erwähnten Aciditätsverhältnisse dürften eine bedeutsame Rolle spielen. Wir wissen aus den Untersuchungen von *Rohde*[1]), daß auf die Aufnahme und Ausscheidung saurer und basischer Farbsalze durch die Epithelzellen der Froschniere die Reaktion den allergrößten Einfluß ausübt. Ferner hat *Terada*[2]) nachgewiesen, daß auf die Dialysegeschwindigkeit von Elektrolyten die Reaktion der Flüssigkeit recht bedeutenden Einfluß haben kann. Diese letzte Vorstellung läßt sich experimentell prüfen, womit wir zurzeit beschäftigt sind. Sie wird aber nur einen Ausschnitt aus den vorliegenden Möglichkeiten geben. Weitere Hinweise wären vielleicht von einer genauen qualitativen Durchforschung der Aminosäurefraktion des normalen Harns zu erwarten. Eine solche ist aber noch viel schwerer durchzuführen als im Blutplasma, da im Harn Abkömmlinge der Aminosäuren verschiedenster Art vorkommen, die noch die chemischen Eigenschaften bis zu einem gewissen Grade zeigen und deshalb in ihrer Gesamtheit sehr schwer abzutrennen sind.

---

[1]) *K. Rohde*, Arch. d. Physiol. **182**, 114, 1920.
[2]) *Y. Terada*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **109**, 199, 1924.

Über die chemischen Vorgänge bei der Lipodiärese in der Lunge.

Von

Ernst Schmitz und Fritz Peiser.

(Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 25. April 1925.)

Die allgemeine Verbreitung fettspaltender Fermente ist seit langer Zeit bekannt, insbesondere ist ihr Vorhandensein in der Lunge schon 1908 von *Sieber*[1]) nachgewiesen und mehrfach von anderer Seite bestätigt worden[2]). Über den weiteren Abbau der Fettsäuren und ihre Oxydation zu Kohlensäure und Wasser sind wir aber nur unterrichtet, soweit die Leber in Frage kommt. Von *Porges* und *Salomon* ist sogar die Lehre vertreten worden, daß die Leber die einzige Stätte des oxydativen Fettabbaues sei, da nach ihrer Entfernung der respiratorische Quotient Werte annimmt, die ein Hinstreben nach der ausschließlichen Verbrennung von Kohlehydrat anzeigen[3]). Freilich ist diesen Versuchen gleich nach ihrem Bekanntwerden und seitdem immer wieder widersprochen worden[4]), und die Ansichten von *Porges* und *Salomon* sind nicht allgemein angenommen worden, ohne daß, wie gesagt, Sicheres über den Mechanismus des Fettabbaues an anderer Stelle bekannt geworden wäre.

Erst in den letzten Jahren wurden aus Frankreich eine Reihe von Arbeiten publiziert, aus denen zu entnehmen ist, daß die Einwirkung der Lunge auf die Fette nicht mit ihrer Spaltung in Fettsäuren und Glycerin abgeschlossen ist. *Roger* und *Binet*[5]) wiesen in einer Reihe von Arbeiten

---

[1]) *N. Sieber*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **55**, 177, 1908.

[2]) *P. Saxl*, diese Zeitschr. **12**, 343, 1908; *Pagenstecher*, ebendaselbst **18**, 285, 1909.

[3]) *O. Porges*, ebendaselbst **27**, 143, 1910; *O. Porges* und *H. Salomon*, ebendaselbst.

[4]) *F. Verzar*, ebendaselbst **34**, 52, 1911; *Grigaut* und *Yovanovitch*, C. r. de la soc. de biol. **92**, 17, 1925.

[5]) *H. Roger* et *L. Binet*, Bull. de l'académie de médécine **86**, 129, 1921; **86**, 79, 203, 1922; **88**, 1079, 1923; *H. Roger*, *L. Binet* und *J. Verne*, ebendaselbst **88**, 1140, 1923.

nach, daß das Blut des rechten Herzens etwa 10 Proz. mehr Fett enthält, als das arterielle Blut, daß also die Lunge eine dementsprechende Menge zurückhält. Diese speichernde Tätigkeit bezeichnen die Autoren in Nachahmung eines Ausdrucks, den *Claude Bernard* für die kohlehydratspeichernde Tätigkeit der Leber geprägt hatte, als Lipopexie. Es handelt sich jedoch nicht um eine bloße Speicherung von Fett, etwa zu dem Zwecke einer späteren Verteilung, sondern um ein Verschwinden des zurückgehaltenen Fettes, eine „Lipodiärese". Die Lunge besitzt nicht nur selbst diese lipodiäretische Kraft, sondern teilt sie auch dem sie durchströmenden Blute mit. Dabei soll es nicht die Sauerstoffaufladung allein sein, die das Arterienblut fähig zur Lipodiärese macht, sondern auch noch eine andere spezifische Veränderung, da das venöse Blut durch Sauerstoffdurchleitung zwar in beschränktem Maße lipodiäretisch wirksam wird, niemals aber in dem Maße, wie das Arterienblut es ist. Im Laufe ihrer Arbeiten sind *Roger* und *Binet* sowie *Sicard, Fabre* und *Forestier*[1]), die ihre Versuche nachprüften und bestätigten, zu der Überzeugung gekommen, daß es sich hier um eine fermentative Oxydation von Fett handelt.

In mehr oder minder hohem Grade sind alle Organe der Lipodiärese fähig. Bei 18stündiger Autolyse von Brei der verschiedenen Organe in der gleichen Menge fluornatriumhaltiger Kochsalzlösung bei 38° wurden für die Abnahmen des Fettgehalts folgende Zahlen gefunden: Leber 41 Proz., Lunge 39 Proz., Mesenterialdrüsen 34 Proz., Pankreas und Niere 31 Proz., Milz 17 Proz., Muskeln 12 Proz., Gehirn 9 Proz. Die Lipodiärese der Lunge und der Mesenterialdrüsen fällt physiologisch besonders ins Gewicht, weil ihnen die im Darm resorbierten Fette zuerst zuströmen. An die Gegenwart von Blut ist die Erscheinung nicht gebunden.

Die Bedeutung des Sauerstoffs für die Lipodiärese erhellt besonders aus folgendem Versuch von *Roger* und *Binet* (l. c., C. r. 88, 1079): Einem Hunde, bei dem durch Abbindung der Arterien an der Halsbasis, des Truncus coeliacus und des Mesenteriums einem Abtransport von Fett aus der Lunge vorgebeugt war, wurden 4 ccm Olivenöl in die Vena saphena injiziert. Ein 5 Minuten danach untersuchtes Lungenstück hatte einen Fettgehalt von 7,99 Proz., nach 2 Stunden wurde in einem Stück, das normal geatmet hatte, 3,53 Proz., in einem anderen, der von der Luft abgeschnitten war, 7,84 Proz. gefunden.

Eine Bestätigung der Befunde von *Roger* und *Binet* lieferte die oben erwähnte Arbeit von *Grigaut* und *Yovanovitch.* Auf die aus dem Fett entstehenden Abwandlungsprodukte ist bis jetzt anscheinend nicht gefahndet worden, wenn man nicht Versuche von *Sicard, Fabre* und *Forestier* hierher rechnen will, in denen ein jodhaltiges Fett, Lipojodol, intravenös oder von der Trachea aus zugeführt und die Jodausscheidung kontrolliert wurde.

Einen etwas näheren Einblick in die chemischen Vorgänge bei der Lipodiärese gewähren aber Untersuchungen, die *U. Lombroso*[2]) zur Nachprüfung der Befunde von *Roger* und *Binet* unternommen hat. Im ganzen gelangte dieser Autor zu einer Bestätigung, konnte aber niemals die Größenordnung der von *Roger* und *Binet* gesehenen Ausschläge erhalten, sondern fand nur Fettabnahmen von 7 bis 20 Proz. Es ergab sich, daß bei der

---

[1]) *J. A. Sicard, R. Fabre* et *G. Forestier,* Bull. de l'académie de médécine 88, 564, 1255, 1923.

[2]) *U. Lombroso,* Arch. intern. de physiol. 22, 1. 9, 1923.

Autolyse der Lunge unter den von den französischen Autoren eingehaltenen Bedingungen zwei verschieden gerichtete Vorgänge ablaufen, von denen der eine zu einem Verlust, der andere zu einem Wiedererscheinen von Fett führt. Bei der Probenahme zu verschiedenen Zeiten erhält man immer nur die arithmetischen Summen beider Vorgänge, die zu verschiedenen Zeiten auch verschiedene Werte besitzen.

Man gewinnt hiernach den Eindruck, daß es sich bei der Lipodiärese um Gleichgewichtsreaktionen handelt, wie solche auch für den Fettumsatz in der Leber charakteristisch und besonders in den letzten Stadien des Fettabbaues hier genau erforscht sind.

Der Abbau der Fettsäuren in der isolierten Leber geschieht nach dem Typus der β-Oxydation, bei dem z. B. aus Buttersäure zunächst β-Oxybuttersäure und weiter Acetessigsäure gebildet wird. Bei Zusatz der beiden erstgenannten Substanzen zum Durchströmungsblut entstehen denn auch außerordentlich große Mengen von Acetessigsäure[1]).

Andererseits haben *Embden* und *Michaud*[2]) gefunden, daß bei Zusatz von acetessigsauren Salzen zu Aufschwemmungen von Leberbrei in Blut oder physiologischer Salzlösung schon in kurzer Zeit große Mengen von Acetessigsäure verschwinden, eine Erscheinung, die von *Friedmann* und *Maase*[3]) auf eine Reduktion von Acetessigsäure zu β-Oxybuttersäure zurückgeführt wurde.

Es ist damit sichergestellt, daß in der Leber β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure durch ein Gleichgewicht miteinander verbunden sind und daß man durch Modifikation der Versuchsbedingungen die Umwandlungsreaktion in die eine oder andere Richtung lenken kann. Es erschien nun reizvoll, die Lipodiärese daraufhin zu prüfen, ob in ihr Vorgänge enthalten sind, die mit β-Oxydation einhergehen. Dieser Gedanke wird einigermaßen nahegelegt durch die von den französischen Autoren immer wieder betonte Wichtigkeit des Sauerstoffs für den Ablauf der Reaktion, die ja geradezu als eine fermentative Oxydation bezeichnet wird. Wir haben deshalb untersucht, ob die Lunge bei kurzer Autolyse zugesetzte Acetessigsäure in β-Oxybuttersäure umwandelt und ob bei der künstlichen Durchströmung der überlebenden Lunge Buttersäure oder β-Oxybuttersäure in Acetessigsäure übergeführt werden.

Über einen Versuch zur Acetessigsäurezerstörung durch Hundelunge berichten schon *Embden* und *Michaud* (l. c. I., S. 345), ohne jedoch auf sein negatives Ergebnis besonderen Wert zu legen.

Die Breiversuche wurden in der von *Embden* und *Michaud* beschriebenen Weise angestellt. Als Material diente Pferdelunge, die

---

[1]) *Embden*, *Salomon* und *Schmidt*, Hofmeisters Beitr. z. Physiol. **7**, 147, 1906.

[2]) *G. Embden* und *L. Michaud*, ebendaselbst **11**, 332, 1908; diese Zeitschr. **13**, 262, 1908.

[3]) *Friedmann* und *Maase*, diese Zeitschr. **27**, 474, 1910.

möglichst bald nach dem Tode des Tieres entnommen, durch die Fleischhackmaschine getrieben und gut durchgemischt wurde. Je 50 g wurden mit der gleichen Menge *Ringer*scher Lösung versetzt, ein Ansatz (A) sofort nach *Schenck* enteiweißt, wobei nach dem Salzsäurezusatz 1 ccm Acetessigsäurelösung zugefügt wurde, der andere mit 1 ccm Acetessigsäurelösung versetzt und 2 Stunden bei 37° aufbewahrt, worauf auch hier die Fällung nach *Schenck* vorgenommen wurde. Die Acetessigsäurelösung wurde für jeden Versuch frisch bereitet, wobei wir uns die neuen Erfahrungen von *Ljunggren*[1]) zunutze machten.

Eine Entquecksilberung der Filtrate erwies sich auch für die Bestimmung der β-Oxybuttersäure als unnötig.

Zur Bestimmung der β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure wurde das Verfahren von *Lublin*[2]) angewendet, mit dessen Ergebnissen wir durchaus zufrieden sind. Es ist nur nötig, den empirischen Faktor zur Bestimmung der Oxybuttersäure, mit dem das Verfahren arbeitet, häufig für die benutzte Apparatur zu kontrollieren. Bei Benutzung von 20 ccm Filtrat genügte die gleiche Menge n/100 Jodlösung als Vorlage. Die folgende Tabelle gibt die auf den ganzen Versuchsansatz berechneten Werte für Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure vor und nach der Bebrütung.

Tabelle I.

Versuch	A (sofort gefällt)		B (nach 90 Minuten gefällt)	
	Acetessigsäure mg	β-Oxybuttersäure mg	Acetessigsäure mg	β-Oxybuttersäure mg
1	59,1	7,5	56,1	21,9
2	57,8	11,0	52,5	22,3
3	57,0	6,9	54,1	17,5
4*)	15,4	4,7	14,2	5,8

*) Je 12 g Kaninchenlunge in A und B.

Das Ergebnis der Versuche ist übereinstimmend, daß eine Abnahme der Acetessigsäure zwar zu verzeichnen ist, sich aber in Grenzen hält, die die methodischen Fehler nicht mit Sicherheit überschreiten. Dagegen liefert die Oxydation mit Kaliumbichromat deutlich größere Mengen an jodbindender Substanz, nachdem Lungengewebe mit Acetessigsäure bei 37° gestanden hat. Die Steigerung beträgt über 100 Proz. der allerdings sehr niedrigen Ausgangswerte. Die Bildung von jodbindender Substanz bei einem so eingreifenden Oxydationsverfahren ist nun kein so charakteristisches Verhalten, daß wir allein daraufhin die Bildung von β-Oxybuttersäure behaupten möchten. Eine Charakterisierung durch Reindarstellung war infolge der sehr geringen ab-

[1]) *G. Ljunggren*, diese Zeitschr. **145**, 422, 1924.
[2]) *A. Lublin*, Klin. Wochenschr. **1**, 1748, 1922.

soluten Menge auch dieser Fraktion nicht möglich. Wir können deshalb weder behaupten, noch ausschließen, daß β-Oxybuttersäure entstanden ist. Auf jeden Fall aber reichen die kleinen von uns beobachteten Abnahmen der Acetessigsäure nicht hin, um die Zunahme der β-Oxybuttersäurefraktion zu decken. Die Neubildung von jodbindender Substanz erfolgt übrigens in dem Lungengewebe und ist nicht an die in ihm noch enthaltenen Blutreste gebunden, denn bei der Aufbewahrung von Pferdeblut mit der gleichen Menge Acetessigsäure blieb sie aus.

Die Frage der Oxydation von Buttersäure und β-Oxybuttersäure untersuchten wir an der künstlich durchströmten überlebenden Katzenlunge. Die Tiere wurden aus den Carotiden entblutet, darauf sofort eine Kanüle in die Trachea eingebunden und die Lunge aufgeblasen. Danach wurde die Aorta unmittelbar am Herzen abgebunden und Kanülen in die Lungenarterie und in das linke Herzohr eingebunden. Das Präparat wurde dann, an der Luftröhrenkanüle hängend, in einen Heizkasten mit Glaswänden eingeführt. Die beiden Kanülen wurden durch Öffnungen in der Seitenwand des Kastens nach außen geführt und die Arterienkanüle mit dem Zufluß-, die aus dem Herzohr kommende mit dem Abflußgefäß verbunden. Die Luftröhrenkanüle stand unter Sauerstoffdruck. In den ersten Versuchen ließen wir die Lunge rhythmisch atmen, jedoch zeigte sich, daß dadurch die Durchströmung leicht ungünstig beeinflußt werden konnte. Die Sauerstoffversorgung war auch bei dem späteren Verfahren mehr als ausreichend, eine venöse Farbe des Blutes haben wir nie beobachtet.

Artfremdes Blut konnten wir nicht verwenden, da bei dem Versuch einer Durchströmung mit sorgfältig defibriniertem Rinderblut sehr bald Verstopfung der Gefäße und starkes Ödem der Lunge eintraten. Wir bedienten uns deshalb des Blutes des Versuchstieres, waren damit allerdings genötigt, stark, etwa auf das 4- bis 5fache, mit *Ringer*scher Lösung zu verdünnen. Wir glaubten aber, uns zu dieser Maßnahme um so eher entschließen zu dürfen, als *Roger* und *Binet* angeben, daß die fettzerstörende Tätigkeit der Lunge nicht von der Gegenwart von Blut abhängig ist. Mit dieser Durchströmungsflüssigkeit, der die Substanz in *Ringer*scher Lösung unmittelbar vor Versuchsbeginn zugesetzt wurde, erreichten wir Strömungsgeschwindigkeiten von bis zu 120 ccm pro Minute, während das Lungengewebe ungefähr 15 g wog. Die Durchblutungen wurden im allgemeinen 90 Minuten lang fortgesetzt. Die Durchströmungsflüssigkeit floß aus einem Trichter, der verschieblich an einem Stativ angebracht war, und trat mit einem Druck von 50 cm Wasser in das Organ ein. Das ausströmende Blut wurde in einem Gefäß gesammelt, das in Wasser von 37° stand. Der Heizkasten war durch eine Kohlenfadenlampe an seinem Boden geheizt und hatte in der Regel eine Temperatur von 36 bis 37°. Nur in den

ersten Versuchen, in denen wir die Öffnungen des Kastens längere Zeit offenhalten mußten, um die Durchblutung in Gang zu bringen, konnten wir diese Temperatur nicht ganz erreichen und hatten zeitweise nur eine solche von 32°.

Nach Schluß der Versuche wurde die ganze Lunge der Durchströmungsflüssigkeit nach *Schenck* enteiweißt, am anderen Tage filtriert und in der gleichen Weise verarbeitet wie der Organbrei in den Versuchen der Tabelle I.

Zwei Leerversuche, mit denen wir unsere Untersuchungen begannen, hatten folgendes Ergebnis:

Tabelle II.

Durchblutungen der Katzenlunge ohne Substanzzusatz.

Versuch	Gewicht des Tieres g	Gewicht der Lunge g	A		B	
			Acetessigsäure mg-Proz.	β-Oxybuttersäure mg-Proz.	Acetessigsäure mg-Proz.	β-Oxybuttersäure mg-Proz.
4	2500	—	1,7	3,1	1,2	5,7
5	2300	—	0,6	3,4	1,4	3,0

Während der Durchströmung der Katzenlunge ohne Zusatz einer acetessigsäurebildenden Substanz tritt also eine maßgebliche Änderung in dem infolge der Verdünnung sehr geringen Gehalt der Durchströmungsflüssigkeit an Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure nicht ein.

In den Versuchen von *Embden* hatte sich als einer der stärksten Acetessigsäurebildner die Buttersäure erwiesen. Wir hatten deshalb den Wunsch, auch diese Säure in unsere Versuche einzubeziehen. Leider stießen wir dabei auf Schwierigkeiten, da bei Zusatz dieser Säure in Gestalt ihres Ammonium- oder Natriumsalzes stets rasch ein völliges Versiegen des Blutstromes eintrat. Wenn wir die buttersäurehaltige Flüssigkeit wieder durch *Ringer*sche Lösung ersetzten, wurde die Lunge in kurzer Zeit wieder normal durchgängig, verstopfte sich aber sofort wieder, wenn wir erneut butyrathaltige Flüssigkeit zirkulieren ließen. Dieses Verhalten hat seinen Grund nicht in einer Säurewirkung auf die Gefäßwände, da wir die Neutralität der Substanzlösungen mit Hilfe der Indikatorenreihe von *Michaelis* kontrolliert hatten ($p_H = 7{,}2$).

Wir kamen schließlich zum Ziel, als wir die Substanzlösung in kleinen Mengen zu dem bereits zirkulierenden Blute zusetzten, wobei die eintretende Hemmung klein war und nach einiger Zeit überwunden wurde. Wir setzten hier (Versuch 8) im ganzen 10 ccm einer Lösung von 1 g Buttersäure in 20 ccm Wasser und 11,6 ccm Normalnatronlauge mit einem p_H von 7,0 zu. In diesem Versuch konnten wir eben-

sowenig wie in den beiden anderen mit Buttersäure ausgeführten eine Veränderung der Konzentration von Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure erreichen.

Tabelle III.

Durchblutung der Katzenleber mit Zusatz von Buttersäure.

Versuch	Gewicht des Tieres g	Durchströmungsflüssigkeit	A Acetessigsäure mg-Proz.	A β-Oxybuttersäure mg-Proz.	B Acetessigsäure mg-Proz.	B β-Oxybuttersäure mg-Proz.
6	1400	35 ccm Blut				
		165 „ Ringer	3,6	5,8	1,8	2,7
7	1700	35 „ Blut				
		165 „ Ringer	1,4	2,1	1,8	2,5
8	1500	20 „ Blut				
		180 „ Ringer	0,4	1,0	0,3	1,9

Nach diesen technisch allerdings wenig guten Versuchen ist die Buttersäure nicht imstande, in der Lunge in β-Oxybuttersäure und in Acetessigsäure überzugehen. Wir prüften deshalb in weiteren Versuchen, ob wenigstens die letzte Etappe der Oxydationsreihe, die Überführung von β-Oxybuttersäure in Acetessigsäure an dieser Stelle vor sich geht. Wir verwendeten ein aus Harn dargestelltes Präparat von aktiver β-Oxybuttersäure, das rein weiß und abgesehen von einem geringen Wassergehalt rein war. Über die fünf Versuche, die wir unter Zusatz dieses Präparats ausführten, berichtet Tabelle IV.

Tabelle IV.

Durchblutungen unter Zusatz von β-Oxybuttersäure.

Versuch	Dauer Min.	Blut in 200 ccm Zirkulationsflüssigkeit ccm	Gewicht des Tieres g	A Acetessigsäure mg-Proz.	A β-Oxybuttersäure mg-Proz.	B Acetessigsäure mg-Proz.	B β-Oxybuttersäure mg-Proz.
9	80	50	2000	3,2	75,9	2,1	49,8
10	60	56	2000	0,8	—	1,3	47,1
11	90	55	2170	0,6	73,3	2,2	49,0
12	60	55	3000	2,9	56,0	2,8	50,5
13	55	45	1900	3,6	50,8	2,7	52,9

Diese fünf Versuche zeigen übereinstimmend, daß eine Neubildung von Acetessigsäure aus β-Oxybuttersäure in der überlebenden Katzenlunge nicht stattfindet. In dem einzigen Versuch (11), in dem der Prozentgehalt an Acetessigsäure in B deutlich höher liegt, ist die Titrationsdifferenz nur 0,5 ccm n/100 Jodlösung, also auch noch nicht deutlich außerhalb der Versuchsfehler.

Dagegen könnte es den Anschein haben, als ob in den ersten drei Versuchen der Tabelle IV ein merklicher Verbrauch von β-Oxybutter-

säure stattgefunden hätte. Dem ist in Wirklichkeit nicht so. In diesen Versuchen war die Entnahme von A vor dem Einbringen des Blutes in den Apparat erfolgt, und somit ist die Konzentrationsverminderung nicht berücksichtigt, die durch die Verteilung auf Blut und Organpräparat entsteht. In den beiden letzten Versuchen haben wir die Entnahme von A erst gemacht, nachdem die gesamte Blutmenge das Herzlungenpräparat zweimal passiert hatte, und es zeigt sich, daß in diesen Versuchen am Schlusse des Versuchs praktisch die ganze Menge der zugesetzten β-Oxybuttersäure noch vorhanden ist.

Wir glauben auf Grund unserer Breiversuche mit Zusatz von Acetessigsäure und der Durchblutungsversuche mit β-Oxybuttersäure ausschließen zu können, daß in der Lunge zwischen diesen beiden Substanzen ein ähnliches Gleichgewicht besteht, wie in der Leber Damit fehlt in der Lunge die in der Leber ausgeprägteste Phase des Fettabbaues, und es erscheint äußerst unwahrscheinlich, daß bei dem Verschwinden der Fette in der Lunge Vorgänge mitspielen, die als echter Fettabbau bezeichnet werden können. Eher könnte man an ähnliche Erscheinungen denken, wie sie bei der obenerwähnten Maskierung der Fette im Blute stattfinden. Auch solche Veränderungen des Fettes könnten für den Abbau von großer Bedeutung sein, insofern sie die Dispersion der Fette außerordentlich erhöhen und damit der fettabbauenden Tätigkeit anderer Organe vorarbeiten könnten.

Pigmentstudien im Anschluß an einen Fall von Ringelhaar.

Von

Karl Klinke.

(Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 25. April 1925.)

In einer Arbeit über einen Fall von Ringelhaar in der Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgschichte berichtet *Hoepke*[1]) über den anatomischen Bau eines von ihm 1 Jahr lang bei einem Studenten beobachteten menschlichen Ringelhaares.

Es handelt sich hierbei um die seltene Anomalie, daß in einem ganz glatten zylindrischen Haarschaft hell und dunkel pigmentierte Stellen abwechseln, die dem Haare ein geringeltes bzw. quergestreiftes Aussehen geben.

Frühere Autoren, wie *Wilson*[2]) und *Lesser*[3]), die ähnliches Haar beschrieben, sahen an den hellen Stellen spindelige Auftreibungen, die offenbar durch eine Gasbildung hervorgerufen waren. Da *Hoepke*[1]) durch Querschneideversuche unter Wasser feststellte, daß die hellen Stellen hohle Kammern waren, in welche die umgebende Flüssigkeit ohne weiteres eindrang, so werden wohl die Fälle identisch sein. Nur war hier eben im Gegensatz zu den angegebenen Beobachtungen das Haar besonders kräftig gebaut (Zerreißversuche ergaben eine erhöhte Zugfestigkeit), so daß keine Auftreibung stattfinden konnte. Das hypothetische Gas ließ sich durch plötzliche Druckerniedrigung mittels der *Gaede*schen Kapselluftpumpe nicht herausdrängen. Wahrscheinlich hängt auch dies mit der besonderen Festigkeit dieses Haares zusammen. Im Haarboden, den *Hoepke*[1]) an einem Stück exzidierter Kopfhaut untersuchte, ließ sich nichts Pathologisches finden.

Das von *Hoepke* untersuchte Haar zeigte insofern eine weitere Anomalie, als es sich im Sommer von der Spitze an heller färbte. Die

---

[1]) *Hoepke*, Zeitschr. f. Anatom. u. Entw.-Gesch. **61**, 523, 1921.
[2]) *Wilson*, Arch. f. Dermat. u. Syph. 1896.
[3]) *Lesser*, ebendaselbst.

Luftringe verschwanden in den blonden Stellen fast gänzlich. Pigment war überall im Haar nachzuweisen, an den pigmentarmen Stellen vermindert, aber noch deutlich gekörnt, in den hellsten Spitzen nur diffus vorhanden.

Die anatomischen Untersuchungen hatten über die Natur des im Haar oder Haarboden sich abspielenden Prozesses keine Klarheit gebracht. *Hoepke*[1]) glaubt, daß es sich um innersekretorische Störungen handelte, die eine Unterbrechung der Pigmentbildung veranlaßten. Diese Erklärung berücksichtigte jedoch nicht das Auftreten von Gas im Haarschaft. Jedenfalls war diesem Problem — wenn überhaupt — nur auf chemischem Wege näher zu kommen.

Die Untersuchungen boten insofern einige Schwierigkeiten, als der einzige chemisch näher untersuchte Farbwechsel des menschlichen Haares, das Ergrauen, als irreversibler Vorgang für das Problem des zur Ringelung führenden intermittierenden Prozesses nicht zum Vergleich herangezogen werden konnte; ferner war die für Analysenzwecke zur Verfügung stehende Haarmenge nur gering (die monatliche Schur betrug etwa 2 bis 3 g); noch dazu ist der Stoffwechsel der Haare als verhornter Gebilde ein sehr träger.

Immerhin boten sich einige Fragen, die chemischer Bearbeitung zugänglich erschienen. Kürzlich hat *Hasebroek*[2]) in einer Arbeit über den Melanismus der Schmetterlinge dem Chitin des Insektenpanzers die Eigenschaft zugeschrieben, Vorstufen für die Pigmentbildung zu speichern. Wenn diese Ansicht zu Recht besteht, so erscheint es durchaus möglich, daß die gleiche Eigenschaft auch den Keratinen zukommt, soweit sie Pigmentträger sind. Eine Anreicherung von solchen, in ihrer chemischen Eigenart noch unbekannten, aber sicher in ihrer Zusammensetzung irgendwelche Besonderheiten bietender Stoffe konnte sich durch Änderungen in der chemischen Zusammensetzung der Haare während der verschiedenen Pigmentierungsperioden kundgeben. Von diesem Gesichtspunkt aus wurde eine fortlaufende Untersuchung der Zusammensetzung der Haare unternommen, wie sie ähnlich schon *Langecker*[3]), allerdings ohne besonderen Erfolg, an menschlichen Nägeln verschiedener Altersstufen ausgeführt hat.

Der Mangel an Pigment, wie ihn *Hoepke* an dem Sommerhaar beobachtet hatte, kann an sich ebensogut die Folge einer Einschränkung der Pigmentbildung wie einer um diese Zeit einsetzenden Zerstörung sein. Eine Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten könnte sich vielleicht aus einer Untersuchung des Inhalts der Luftringe ergeben.

---

[1]) *Hoepke*, Zeitschr. f. Anat. u. Entw.-Gesch. **61**, 523, 1921.
[2]) *Hasebroek*, Zeitschr. f. Fermentf. **7**, 3.
[3]) *Langecker*, Hoppe-Seyler **115**, 21, 1921.

Die Farbenunterschiede der Haarpigmente sind mit den verschiedensten Substanzen in Zusammenhang gebracht worden. Man glaubte zunächst, daß es die anorganischen Elemente seien, die den Charakter der Haarfarbe bedingten. So stellte *Baudrimont*[1]) die Behauptung auf, daß die dunklen Haare eisenreicher seien als die hellen. Doch sprechen seine Analysenresultate nicht im mindesten für seine Annahme. Vielmehr konnte *Sieber*[2]) zeigen, daß Eisen kein wesentlicher Bestandteil des Pigments ist.

Für das graue Haar stellte *Baudrimont*[1]) einen erhöhten Calciumgehalt fest. Dieser Befund ist aber wohl nur eine Teilerscheinung der im Alter allgemein in den Geweben stattfindenden Kalkablagerung und hat mit dem Farbproblem als solchem nichts zu tun.

Ungeklärt ist die Frage der Beteiligung des Schwefels. *v. Fürth*[3]) hält nach seinen Untersuchungen den Schwefel wie das Eisen für keine notwendig zum Pigment gehörigen Bausteine. Doch gibt *Mohr*[4]) Zahlen an (4,95 Proz. Schwefel für helles, 5,34 Proz. Schwefel für dunkles Haar), die doch für eine gewisse Beteiligung dieses Elements an der Haarfärbung sprechen. Als Besonderheit sei erwähnt, daß *Sieber*[2]) und *Rutherford*[5]) einen auffällig hohen Schwefelgehalt in den roten Haaren fanden.

Heute wird wohl die Färbung der Haare auf eine verschiedene Mischung der beiden Haarpigmente, des diffusen gelösten Hornpigments und des gekörnten Pigments zurückgeführt [*Unna* und *Golodetz*[6]), *Riehl*[7])]. Bei einem Überwiegen des ersteren kommt es zu einem weißblonden, andernfalls zu einem dunklen bis schwarzen Haar. Das weiße Haar verdankt seine Farbe der im Alter abnehmenden Oxydationsfähigkeit der Körperzellen [*Bloch*[8])]. Die Frage des roten Haares, das nur gelöstes Pigment enthalten soll, steht aber auch dann noch ungeklärt da.

Vielleicht sind auch die einzelnen Melanine der verschiedenen Haarfarben uneinheitliche Körper, so daß auch dies zu den mannigfachsten Variationen beitragen könnte. Wir sind ja bis heute in bezug auf die Zusammensetzung des Melanins nur auf Theorien angewiesen.

---

[1]) *Baudrimont*, zitiert nach *Aron*, Tegumente, Handb. d. Biochem. **2**, 1912.

[2]) *Sieber*, Arch. f. exper. Pathol. **20**, 362.

[3]) *v. Fürth*, Gewebschemie 1914.

[4]) *Mohr*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **20**, 403.

[5]) *Rutherford*, Journ. of biol. Chem. **8**.

[6]) *Unna* und *Golodetz*, Biochemie der Haut, Handb. d. Biochem. 1912, Erg.-Bd.

[7]) *Riehl*, Lehrb. d. Hautkrankheiten.

[8]) *Bloch*, Arch. f. Dermat. u. Syphil. **135**, 77, 1922.

Das liegt daran, daß das Melanin bei den gebräuchlichen Arten der Hydrolyse gar nicht gelöst, bei stärker angreifenden Oxydations- bzw. Reduktionsmethoden aber weitgehend zerstört wird. Jedenfalls sind wir nur in der Lage zu sagen, daß die zyklischen Eiweißkerne die Bausteine des Melanins liefern. Insbesondere kommt nach *v. Fürths*[1]), *Blochs*[2]) und *Przibrams*[3]) Untersuchungen das Tyrosin bzw. sein Oxydationsprodukt, das Dioxyphenylalanin sowie das Tryptophan, dafür in Betracht.

Nach diesen Überlegungen mußten sich vergleichende Untersuchungen der verschiedenen Haarfarben mit dem Ringelhaar auf den Schwefel- bzw. Cystin-, Tyrosin- und Tryptophangehalt erstrecken. Bei den Untersuchungen des Gehalts an den genannten Aminosäuren, die im Hydrolysat der Haare angestellt wurden, war mir von vornherein klar, daß sie sich nur auf die Keratinsubstanz und auf das diffuse lösliche Hornpigment (*Unna* und *Golodetz*) erstrecken konnten. Das gekörnte Pigment konnte nicht mit erfaßt werden, denn einerseits ist es noch nie gelungen, in gereinigtem Pigment eine der drei Aminosäuren nachzuweisen, andererseits gibt *v. Fürth*[4]) an, daß Melanin sich in konzentriertem SO_4H_2 wohl in der Wärme löse, beim Erkalten und Wasserzusatz aber sofort wieder ausfalle. Das bestätigte sich auch bei meinen Untersuchungen: Bei allen Hydrolysen blieb — bei negativer Biuretprobe — ein dichter Bodensatz von Melanin zurück, der abfiltriert werden mußte. Unerläßlich erschien ferner, da ja das Pigment ein Eiweißabkömmling ist, die Bestimmung des Stickstoffgehalts.

Die Schwefel- und Stickstoffbestimmungen, die hauptsächlich der Klärung der Frage dienten, ob das sommerliche Haar einen Unterschied von dem winterlichen zeigte, wurden durch 13 Monate in der vier- bis fünfwöchigen Schur der Ringelhaare vorgenommen (Tabelle I und II). Sie ergaben keine Anhaltspunkte für eine Beteiligung dieser Substanzen am Auftreten der Ringelung und der sommerlichen Verfärbung. Der Schwefelgehalt, nach *Hedwig Langeckers*[5]) Methode bestimmt, schwankte zwischen 3,04 und 4,07 Proz. der lufttrockenen Substanz. Die Werte stiegen vom Juni 1921 bis Juli 1922 ziemlich gleichmäßig an, und nach später anzuführenden Versuchen ist die Steigerung wohl auf Rechnung der sich im Jahre 1921 allmählich bessernden Eiweißversorgung zu setzen. Im Verhältnis zu den Werten aus der Literatur [*Mohr* 4,95 bis 5,34 Proz., *v. Bibra*[6]) 3,7 bis 7,9 Proz.]

[1]) *v. Fürth*, Hofmeisters Beitr. **1**, 229. 1901.
[2]) *Bloch*, Hoppe-Seyler **98**, 226, 1917.
[3]) *Przibram*, Arch. f. Entw.-Gesch. 1921, S. 148.
[4]) *v. Fürth*, Melanie, Handb. f. Biochem. **1**, 743, 1913.
[5]) *Langecker*, Hoppe-Seyler **115**, 21, 1921.
[6]) *v. Bibra*, zitiert nach *Aron*, Tegumente, Handb. d. Biochem. **2**, 1912.

Tabelle I.

Schwefelgehalt.

Monat	Haarmenge g	$BaSO_4$ g	S g	S Proz.
Juni 1921 .	0,200	0,0452	0,006 208 7	3,10
	0,200	0,0443	0,006 085 0	3,04
Juli	0,400	0,0888	0,012 198	3,05
	0,400	0,0897	0,012 321	3,08
August . .	0,5465	0,1224	0,016 813	3,08
September	0,4310	0,1234	0,016 565	3,84
	0,5663	0,1470	0,020 184	3,56
Oktober . .	0,5543	0,1367	0,018 777	3,39
	0,5199	0,1361	0,018 687	3,59
November .	0,5790	0,1508	0,020 714	3,58
	0,4320	0,1097	0,015 065	3,49
Dezember .	1,0500	0,2829	0,058 859	3,70
	0,6743	0,1897	0,026 044	3,86
Januar 1922	0,7470	0,2008	0,027 582	3,69
	0,5730	0,1463	0,020 095	3,51
Februar . .	0,7926	0,2110	0,028 983	3,66
	0,5927	0,1532	0,021 044	3,55
März . . .	0,9588	0,2735	0,037 568	3,92
	0,4522	0,1281	0,017 595	3,89
April . . .	0,4002	0,1138	0,015 632	3,91
	0,4878	0,1336	0,018 351	3,76
Mai	0,4302	0,1080	0,014 835	3,78
	0,5030	0,1304	0,017 884	3,56
Juni . . .	0,5522	0,1640	0,022 517	4,07
	0,5111	0,1490	0,020 457	4,00

Tabelle II.

Stickstoffgehalt.

Monat	Haarmenge g	N-Gehalt g	N Proz.	Monat	Haarmenge g	N-Gehalt g	N Proz.
Juni 1921 .	0,05	0,007 021	14,0	Januar 1922	0,10	0,013 650	13,6
	0,05	0,006 989	13,9		0,10	0,013 496	13,5
Juli	0,10	0,014 140	14,1	Februar	0,10	0,014 242	14,2
	0,10	0,014 014	14,0		0,10	0,014 268	14,3
August . .	0,05	0,007 266	14,5	März	0,10	0,014 318	14,3
	0,05	0,007 228	14,4		0,10	0,014 298	14,3
September .	0,05	0,007 016	14,2	April	0,10	0,013 988	14,0
	0,05	0,006 972	13,9		0,10	0,014 002	14,0
Oktober . .	0,10	0,013 876	13,9	Mai	0,10	0,014 104	14,1
	0,10	0,013 916	13,9		0,10	0,014 126	14,1
November .	0,10	0,015 288	15,3	Juni	1,10	0,013 996	14,0
	0,10	0,015 260	15,3		0,10	0,014 008	14,0
Dezember .	0,10	0,014 280	14,3				
	0,10	0,014 322	14,3				

stehen die Ringelhaare mit einem Durchschnitt von 3,5 Proz. an unterster Stelle.

Der Stickstoffgehalt blieb ebenfalls sehr gleichmäßig auf etwa 14 Proz. mit geringen Schwankungen. Nur im November 1921, als das Haar wieder dunkler zu werden begann, wurde ein einmaliger hoher Wert von 15,3 Proz. gefunden. Als Vergleichszahl fand ich nur eine Notiz von *Schlossberger*[1]), der etwa 17 Proz. angibt.

Die Cystin-, Tyrosin- sowie Tryptophanbestimmungen, die einen Vergleich der Ringelhaare mit anderen Haaren ermöglichen sollten, mußten auf die Normalhaare verschiedener Färbung ausgedehnt werden, da noch keine derartigen Untersuchungen vorliegen. Wie schon oben auseinandergesetzt, konnte aus Verschiebungen nur indirekt ein Schluß auf das Pigment gezogen werden, da sich die Resultate nur auf die Keratinsubstanz bezogen. Die Analysen selbst wurden, da gravimetrische Methoden umständlich und bei der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmenge ungenau waren, nach der von *Folin* und *Looney*[2]) angegebenen kolorimetrischen Methode zur Bestimmung von Cystin, Tyrosin und Tryptophan unternommen. Diese Bestimmungsweise erwies sich, wie Kontrollanalysen zeigten, als sehr zuverlässig. Der durch Harnsäure etwa hervorgerufene Fehler war bei der Art des Materials völlig zu vernachlässigen. Zur Farbvergleichung stand ein Dubosqkolorimeter zur Verfügung.

Zur Untersuchung kamen blondes, schwarzes, rotes und Ringelhaar. Blondes und schwarzes Haar waren vom Friseur bezogenes Mischhaar.

Methodik.

Je 1,00 g der mit Alkohol und Äther entfetteten Haare (in zwei Fällen — Tabelle I, 2 und 5 — wurden nur 0,75 g verwendet) wurden für die Cystinbestimmung 24 Stunden mit 25 ccm 20proz. SO_4H_2 hydrolysiert. Dann wurde zu 100,0 aufgefüllt und 3,0 ccm der klaren Lösung, die einen Bodensatz von Melanin enthielt, sowie zwei Kontrollen in je ein 100,0-Kölbchen übergeführt. Gleichzeitig wurden von einer 0,1proz. Cystinstandardlösung in 5proz. SO_4H_2 zwei Vergleichslösungen zu 1,0 und 3,0 ccm angesetzt.

In jedes Kölbchen kamen nun 50 ccm gesättigter Natriumcarbonatlösung und schließlich 10 ccm 20proz. Natriumsulfitlösung. (Durch letzteres wird die Reduktion des Cystins zu dem die Farbreaktion gebenden Cystein bewirkt.) Nach gründlichem Schütteln wurde 10 Minuten gewartet, zu jedem Kölbchen 3 ccm *Folins* Harnsäurereagens zugesetzt, aufgefüllt und mit dem farbähnlicheren Standard die Farbvergleichung ausgeführt.

Für die Tyrosin- und Tryptophanbestimmung gelangten die gleichen Mengen wie oben zur Verwendung. Hydrolysiert wurde 48 Stunden mit

[1]) *Schlossberger*, Handb. d. Biochem. 2, 1912.

[2]) *Folin* und *Looney*, Journ. of biol. Chem. 51, 421, 1922.

Tabelle I.

Schwefelgehalt.

Monat	Haarmenge g	$BaSO_4$ g	S g	S Proz.
Juni 1921 .	0,200	0,0452	0,006 208 7	3,10
	0,200	0,0443	0,006 085 0	3,04
Juli	0,400	0,0888	0,012 198	3,05
	0,400	0,0897	0,012 321	3,08
August . .	0,5465	0,1224	0,016 813	3,08
September	0,4310	0,1234	0,016 565	3,84
	0,5663	0,1470	0,020 184	3,56
Oktober . .	0,5543	0,1367	0,018 777	3,39
	0,5199	0,1361	0,018 687	3,59
November .	0,5790	0,1508	0,020 714	3,58
	0,4320	0,1097	0,015 065	3,49
Dezember .	1,0500	0,2829	0,058 859	3,70
	0,6743	0,1897	0,026 044	3,86
Januar 1922	0,7470	0,2008	0,027 582	3,69
	0,5730	0,1463	0,020 095	3,51
Februar . .	0,7926	0,2110	0,028 983	3,66
	0,5927	0,1532	0,021 044	3,55
März . . .	0,9588	0,2735	0,037 568	3,92
	0,4522	0,1281	0,017 595	3,89
April . . .	0,4002	0,1138	0,015 632	3,91
	0,4878	0,1336	0,018 351	3,76
Mai	0,4302	0,1080	0,014 835	3,78
	0,5030	0,1304	0,017 884	3,56
Juni . . .	0,5522	0,1640	0,022 517	4,07
	0,5111	0,1490	0,020 457	4,00

Tabelle II.

Stickstoffgehalt.

Monat	Haarmenge g	N-Gehalt g	N Proz.	Monat	Haarmenge g	N-Gehalt g	N Proz.
Juni 1921 .	0,05	0,007 021	14,0	Januar 1922	0,10	0,013 650	13,6
	0,05	0,006 989	13,9		0,10	0,013 496	13,5
Juli	0,10	0,014 140	14,1	Februar	0,10	0,014 242	14,2
	0,10	0,014 014	14,0		0,10	0,014 268	14,3
August . .	0,05	0,007 266	14,5	März	0,10	0,014 318	14,3
	0,05	0,007 228	14,4		0,10	0,014 298	14,3
September .	0,05	0,007 016	14,2	April	0,10	0,013 988	14,0
	0,05	0,006 972	13,9		0,10	0,014 002	14,0
Oktober . .	0,10	0,013 876	13,9	Mai	0,10	0,014 104	14,1
	0,10	0,013 916	13,9		0,10	0,014 126	14,1
November .	0,10	0,015 288	15,3	Juni	1,10	0,013 996	14,0
	0,10	0,015 260	15,3		0,10	0,014 008	14,0
Dezember .	0,10	0,014 280	14,3				
	0,10	0,014 322	14,3				

stehen die Ringelhaare mit einem Durchschnitt von 3,5 Proz. an unterster Stelle.

Der Stickstoffgehalt blieb ebenfalls sehr gleichmäßig auf etwa 14 Proz. mit geringen Schwankungen. Nur im November 1921, als das Haar wieder dunkler zu werden begann, wurde ein einmaliger hoher Wert von 15,3 Proz. gefunden. Als Vergleichszahl fand ich nur eine Notiz von *Schlossberger*[1]), der etwa 17 Proz. angibt.

Die Cystin-, Tyrosin- sowie Tryptophanbestimmungen, die einen Vergleich der Ringelhaare mit anderen Haaren ermöglichen sollten, mußten auf die Normalhaare verschiedener Färbung ausgedehnt werden, da noch keine derartigen Untersuchungen vorliegen. Wie schon oben auseinandergesetzt, konnte aus Verschiebungen nur indirekt ein Schluß auf das Pigment gezogen werden, da sich die Resultate nur auf die Keratinsubstanz bezogen. Die Analysen selbst wurden, da gravimetrische Methoden umständlich und bei der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmenge ungenau waren, nach der von *Folin* und *Looney*[2]) angegebenen kolorimetrischen Methode zur Bestimmung von Cystin, Tyrosin und Tryptophan unternommen. Diese Bestimmungsweise erwies sich, wie Kontrollanalysen zeigten, als sehr zuverlässig. Der durch Harnsäure etwa hervorgerufene Fehler war bei der Art des Materials völlig zu vernachlässigen. Zur Farbvergleichung stand ein Dubosqkolorimeter zur Verfügung.

Zur Untersuchung kamen blondes, schwarzes, rotes und Ringelhaar. Blondes und schwarzes Haar waren vom Friseur bezogenes Mischhaar.

Methodik.

Je 1,00 g der mit Alkohol und Äther entfetteten Haare (in zwei Fällen — Tabelle I, 2 und 5 — wurden nur 0,75 g verwendet) wurden für die Cystinbestimmung 24 Stunden mit 25 ccm 20proz. SO_4H_2 hydrolysiert. Dann wurde zu 100,0 aufgefüllt und 3,0 ccm der klaren Lösung, die einen Bodensatz von Melanin enthielt, sowie zwei Kontrollen in je ein 100,0-Kölbchen übergeführt. Gleichzeitig wurden von einer 0,1proz. Cystinstandardlösung in 5proz. SO_4H_2 zwei Vergleichslösungen zu 1,0 und 3,0 ccm angesetzt.

In jedes Kölbchen kamen nun 50 ccm gesättigter Natriumcarbonatlösung und schließlich 10 ccm 20proz. Natriumsulfitlösung. (Durch letzteres wird die Reduktion des Cystins zu dem die Farbreaktion gebenden Cystein bewirkt.) Nach gründlichem Schütteln wurde 10 Minuten gewartet, zu jedem Kölbchen 3 ccm *Folins* Harnsäurereagens zugesetzt, aufgefüllt und mit dem farbähnlicheren Standard die Farbvergleichung ausgeführt.

Für die Tyrosin- und Tryptophanbestimmung gelangten die gleichen Mengen wie oben zur Verwendung. Hydrolysiert wurde 48 Stunden mit

[1]) *Schlossberger*, Handb. d. Biochem. 2, 1912.
[2]) *Folin* und *Looney*, Journ. of biol. Chem. 51, 421, 1922.

3,5 g kristallisiertem Bariumhydroxyd in 25 ccm Wasser. Zur abgekühlten Lösung kamen 30 ccm 20proz. SO_4H_2. Der sich bildende Schwefelwasserstoff wurde durch Kochen auf dem Wasserbade vertrieben. Nach Auffüllen auf 100,0 wurde von dem dichten Bodensatz durch ein trockenes Filter in ein trockenes Gefäß abfiltriert. Von dem klaren Filtrat wurden 5 bis 8 ccm in ein Zentrifugierröhrchen gebracht, das auf 10,0 graduiert war. Nun kamen in das Röhrchen 2 ccm einer 5proz. Lösung von Merkurisulfat in 5proz. SO_4H_2 und gegebenenfalls die nötige Menge 5proz. SO_4H_2, um auf 10,0 aufzufüllen. Das Röhrchen blieb nach gründlichem Schütteln (Gummipfropfen) 2 Stunden stehen und wurde dann scharf zentrifugiert. Von der oben stehenden klaren Flüssigkeit wurden 5,0 ccm in ein 100,0-Kölbchen übergeführt. Gleichzeitig wurde 1,0 ccm einer 0,1proz. Lösung von Tyrosin in 5proz. SO_4H_2 in einem gleichen Kölbchen mit 1 ccm oben beschriebener Merkurisulfatlösung versetzt und 3 ccm 5proz. SO_4H_2 hinzugefügt. In jedes Kölbchen kamen nun 30 ccm Wasser und 20 ccm gesättigter Natriumcarbonatlösung. Ein gelber Niederschlag fiel aus, der auf Zusatz von 4 ccm 5proz. wässeriger Cyankalilösung völlig in Lösung ging. Nun kamen noch in jedes Kölbchen 2 ccm Phenolreagens. Nach ½stündigem Stehen wurde aufgefüllt und kolorimetriert.

Für die Tryptophanbestimmung wurde der im Zentrifugengläschen verbliebene Niederschlag verwendet. Nach zweimaligem Abheben, Schütteln mit 5proz. SO_4H_2, Zentrifugieren und wiederum Abheben wurde mit etwa 5 ccm Wasser eine möglichst gleichmäßige Emulsion des Bodensatzes hergestellt. 1,0 ccm einer 0,1proz. Tryptophanlösung in 5proz. SO_4H_2 wurde in völlig gleicher Weise mit Merkurisulfat gefällt und weiter behandelt. Nun kamen in jedes Röhrchen 5,0 ccm 4proz. Cyankalilösung, die eine klare Lösung der Emulsion bewirken. Sodann wurde in ein 100,0-Kölbchen übergeführt und 20 ccm gesättigter Natriumcarbonatlösung sowie etwa 30 ccm Wasser hinzugefügt. Schließlich wurden 2,0 ccm Phenolreagens hineinpipettiert. Nach ½stündigem Stehen wurde aufgefüllt und kolorimetriert.

Das Phenolreagens war folgendermaßen hergestellt. 3 g Molybdänsäure und 2 g Natriumhydroxyd wurden mit 40 ccm Wasser so lange gekocht, bis jeglicher Ammoniakgeruch verschwunden war. Dann wurden 20 g Natriumwolframat, 10 ccm 85proz. Phosphorsäure und 10 ccm 25proz. Salzsäure hinzugefügt. Das Gemisch wurde 10 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Durch Zusatz von einigen Tropfen Bromwasser entfärbte sich die dunkelgrüne Farbe zu hellgelbgrün. Der Bromüberschuß wurde durch Kochen vertrieben und das Reagens auf 200,0 aufgefüllt.

Besprechung der Ergebnisse.

Im Vergleich zu den Werten in Tab. III geben *Folin* und *Looney* für Cystin 16,5 Proz. im menschlichen Haare an. Tyrosin und Tryptophan wurden von ihnen nicht bestimmt. Nach anderen Methoden gewannen *Mörner*[1]) und *Buchtala*[2]) die Werte von 13,92 bzw. 14,53 Proz. für Cystin. Für Tyrosin findet *Abderhalden*[3]) in Hornsubstanzen den Wert von etwa

[1]) *Mörner*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **20**, 403.
[2]) *Buchtala*, ebendaselbst **52**, 474, 1907.
[3]) *Abderhalden*, zitiert nach *Mohr*, Zeitschr. f. phys. Chem. **20**, 403.

Tabelle III.
Cystin-, Tyrosin- und Tryptophangehalt verschiedener Haare.

	S-Gehalt Proz.	Aus S berechneter Cystingehalt	Gefundener Cystingehalt	Differenz	Tyrosingehalt	Tryptophangehalt
Blondes Haar I	3,54		13,8		4,4	0,8
	3,49		13,0		4,7	0,9
			13,0		4,3	0,9
	3,52	13,7	13,3	— 0,4	4,5	0,9
Blond. Haar II	4,58		17,0		4,7	1,1
	4,31		17,1		4,8	0,9
			16,8		4,6	1,0
	4,45	17,4	17,0	— 0,4	4,7	1,0
Rotes Haar I	4,78		14,8		5,5	1,3
	4,58		14,5		5,5	1,5
			14,3		5,1	1,5
	4,68	18,3	14,5	— 3,8	5,4	1,4
Schwarz. Haar	4,83		17,6		4,2	1,6
	4,68		17,6		4,0	1,3
			16,9		4,1	1,3
	4,76	18,5	17,4	— 1,1	4,1	1,4
Ringelhaar April	3,91		14,2		6,6	1,4
	3,76		13,7		6,5	1,1
			14,3		7,0	1,1
	3,84	15,0	14,0	— 1,0	6,7	1,2
Mai	3,78		15,2		5,8	1,1
	3,56		13,5		6,0	1,1
			13,0		6,2	1,1
	3,67	14,3	13,3	— 1,0	6,0	1,1
Juni	4,07		15,0		5,7	1,1
	4,00		14,9		6,0	1,3
			15,0		6,0	1,3
	4,04	15,8	15,0	— 0,8	5,9	1,2
Rotes Haar II	4,65		13,4		5,2	1,2
	4,65		13,1		5,3	1,3
			13,1		5,2	1,0
	4,65	18,2	13,2	— 5,0	5,2	1,2
Weißblondes Haar von alimentärem Ödem, auffällig dünn	4,08		15,8		3,7	0,6
	4,00		15,8		3,6	0,7
			16,0		3,9	0,6
	4,04	15,8	15,9	+ 0,1	3,8	0,6

3,5 Proz., *Unna* und *Godoletz*[1]) geben für menschliches Haar 4,6 Proz. an. Ein Tryptophangehalt der Haare wurde von *Fasal*[2]) ganz in Abrede

[1]) *Unna* und *Godoletz*, Biochemie der Haut, Handb. d. Biochem. 1912, Erg.-Bd.
[2]) *Fasal*, diese Zeitschr. **55**, 393, 1913.

gestellt, doch finden *v. Fürth* und *Lieben*[1]) mit der *Voisenet*schen Methode im Keratin 1,2 Proz.

Die Tabelle zeigt in vieler Hinsicht bemerkenswerte Ergebnisse. Zunächst in bezug auf das Cystin. Die weitgehende Übereinstimmung des aus dem Schwefelgehalt berechneten mit dem gefundenen Cystinwert bestätigt vollauf *Mörners* und *Buchtalas* Ansicht, daß sämtlicher Schwefel in den Keratinsubstanzen als Cystinschwefel gebunden sei. Gleichzeitig zeigen diese Resultate aber auch die Schwefelfreiheit des gekörnten Pigments, denn der gesamte, nach der Mineralisierung nachweisbare Schwefel wird in dem hydrolysierbaren Anteil des Haares als Cystin wiedergefunden. Damit läßt sich eine Beteiligung dieser Substanz am Melaninaufbau mit Sicherheit ausschließen.

Eine eigenartige Sonderstellung nehmen die roten Haare ein. Statt der berechneten 18,3 bzw. 18,2 Proz. wurden nur 14,5 bzw. 13,2 Proz. gefunden. Die beiden untersuchten Haarproben stammten von zwei verschiedenen Menschen, so daß der Gedanke an eine individuelle Eigentümlichkeit abzulehnen ist. Ebensowenig kommt eine unvollständige Hydrolyse in Betracht. Die Biuretprobe war in beiden Fällen negativ. Man ist also gezwungen, eine grundsätzlich andersartige Verteilung des Schwefels im roten Haar anzunehmen. Als Erklärung lassen sich verschiedene Möglichkeiten denken: Das rote Haar könnte Schwefel in freier bzw. locker gebundener Form enthalten; oder der Schwefel wäre im Cystin gebunden, letzteres aber im Melanin fest verankert, oder es wäre ein andersartiger schwefelhaltiger Eiweißkörper im roten Haar vorhanden, der sich nicht zu Cystein reduzieren ließe. Die Klärung dieser Fragen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, ist aber in Bearbeitung.

Beim Ringelhaar war zu Beginn der Untersuchung der Schwefel- und damit Cystingehalt auffällig niedrig (3,5 bzw. 14,5 Proz.), stieg aber während des folgenden Jahres 1921 merklich an. Nun hat *Zuntz*[2]) nachgewiesen, daß durch Zufuhr von Keratinbausteinen eine beträchtliche Steigerung des Haarwuchses erzielt werden könne. Er verfütterte ein Hornhydrolysat und erreichte damit eine starke Beeinflussung des menschlichen wie tierischen Haarwuchses. Nachfolgende Untersucher haben dies bestätigt [*Pulay*[3]), *Fuss*[4])]. Es lag damit nahe, die Steigerung des Schwefelgehalts im Haar auf die in dem genannten Jahre allmählich eintretende Besserung der Eiweißversorgung zurückzuführen. Mit der von *Zuntz* angegebenen spezifischen Ernährung war das Mittel in die Hand gegeben, die Frage zu entscheiden. Deshalb

[1]) *v. Fürth* und *Lieben*, diese Zeitschr. **109**, 124, 1922.
[2]) *Zuntz*, Deutsch. med. Wochenschr. 1920, S. 622.
[3]) *Pulay*, Med. Klinik 1921, S. 48.
[4]) *Fuss*, Wien. klin. Wochenschr. 1920, S. 32.

wurde 2 Wochen lang das *Zuntz*sche Präparat „Humagsolan" gegeben. Die Wirkung auf den Haarwuchs war so stark, daß die Haarschur schon nach 2 Wochen statt wie beabsichtigt nach 4 Wochen vorgenommen werden mußte. Die Analyse des sich übrigens in der Ringelung von früherem Haar nicht unterscheidenden Haares ergab eine Erhöhung des Schwefel- und Cystingehalts; Tyrosin und Trypthophan blieben unbeeinflußt. Nachstehend die Resultate:

S	Cystin berechnet	Cystin gefunden	Tyrosin	Tryptophan
4,96	18,85	18,2	5,8	1,1

Durch dieses Resultat wird die Annahme bestätigt, daß Schwefel- und Cystinreichtum der Haare weitgehend von der Ernährung abhängig sind. In Parallele dazu steht das dünne schüttere Haar bei Hungerödem. Die Analyse eines solchen Haares, Tabelle III, 9, ergab normalen Schwefelgehalt, aber nur 3,8 Proz. Tyrosin und nur 0,6 Proz. Tryptophan. Jedenfalls beteiligt sich nach diesen Zahlen das Haar viel stärker am Gesamtstoffwechsel als bisher angenommen wurde.

Der Tyrosingehalt der Haare verschiedener Färbung zeigt ebenfalls eigenartige Unterschiede.

Die Ringelhaare haben gegenüber dem sehr gleichmäßigen Befund bei blondem und schwarzem Haar einen fast um ein Drittel höheren Tyrosingehalt. Auch das rote Haar zeigt eine deutliche Erhöhung. Diese Differenzen beziehen sich nach den obigen Ausführungen nur auf die Keratinsubstanz. Doch besteht anscheinend eine gewisse Abhängigkeit vom Pigmentgehalt. Denn das Ringelhaar mit seinem doch fast auf die Hälfte verringerten Pigment zeigt den höchsten Tyrosingehalt. Auch bei den roten Haaren ist eine Pigmentarmut vorhanden. [Weiß man doch von den rothaarigen Menschen, daß sie eine sehr weiße, durch Sonnenlicht kaum oder nur krankhaft (Epheliden) pigmentierbare Hautfarbe besitzen.] Eine Vermehrung der gesamten Keratinsubstanz auf Kosten des Pigments kommt nicht in Frage, denn der Cystingehalt ist bei beiden Haaren eher niedriger als normal. So drängt sich die Frage auf, ob das Tyrosin nicht unverbrauchte Muttersubstanz des Pigments sein könne. Jedes Haar, könnte man annehmen, hätte dann einen bestimmten Tyrosingehalt mitbekommen, der zum Teil zu Pigment umgewandelt würde, während der Rest im Keratin bliebe und (nach *Unna* und *Golodetz*) als Leitkörper der Verhornung diente.

Noch immer ist die Frage nach der Muttersubstanz des Melanins nicht geklärt. *Bloch*[1]) nimmt an — und seine Versuche sprechen dafür —,

[1]) *Bloch*, Arch. f. Dermat. u. Syphil. **124**, 129, 1917.

daß nur das Oxydationsprodukt des Tyrosins, das Dioxyphenylalanin — nicht die Grundsubstanz selbst —, befähigt sei, Melanin zu bilden. Dieses entsteht nach seinen Untersuchungen unter dem Einfluß eines spezifischen Ferments, der Dopaoxydase. Er hat das Dioxyphenylalanin zum Nachweis der hypothetischen Dopaoxydase benutzt und damit eine Reaktion zum Nachweis der Pigmentbildungsstätten geschaffen.

Demgegenüber steht *v. Fürth* auf dem Standpunkt, daß die zyklischen Eiweißkerne, insbesondere Tyrosin und Tryptophan, die Grundsteine des Melanins seien. *Przibram* hat erst kürzlich den Nachweis erbracht, daß Tyrosin durch tierische Tyrosinase, die von Peroxydase frei war, zu einem ganz ähnlichen melaninartigen Körper oxydiert wird wie das Dioxyphenylalanin, wenn auch in erheblich längerer Zeit als letzteres. Er behauptet sogar, daß schon die Alkaleszenz des Gewebssaftes hinreiche, die Dopareaktion positiv ausfallen zu lassen. Daß dem wirklich so ist, sieht man aus den vielen Mißerfolgen, die Nachuntersucher *Blochs* bei der Ausstellung der Dopareaktion durch den sogenannten Wasserfehler bekamen.

Meine Resultate scheinen dafür zu sprechen, daß Tyrosin zum Melaninaufbau benötigt wird und zu Zeiten, wo dieser eingeschränkt ist, liegen bleibt. Das schließt aber nicht aus, daß das Dopa eine Zwischenstation auf dem Wege vom Tyrosin zum Melanin ist, und nimmt der *Bloch*schen Reaktion nichts von ihrer Bedeutung als Maßstab für die Stärke bzw. das Vorhandensein einer Pigmentbildung.

Den naheliegenden endgültigen Schluß auf die Bildung des Pigments aus Tyrosin hätte man ziehen dürfen, wenn es gelungen wäre, im Haarboden des Ringelhaares mittels der Dopareaktion die Zeichen einer intermittierenden Pigmentbildung nachzuweisen. In Betracht kam als solches Zeichen das von *Miescher*[1]) beschriebene Auftreten einer Schwärzung mittels Dopa in der Papille beim Haarwechsel und beim Ergrauen.

Andererseits war es aber auch möglich, daß sich der zur Ringelung führende Prozeß oberhalb der Papille abspielte. Damit war auch ein normaler Ausfall der Dopareaktion erklärbar.

So wurde ein Stück Kopfhaut, auf der geringeltes Haar wuchs, ohne irgendwelche Narkose — um Gewebsalterationen zu vermeiden — exzidiert. Das Hautstückchen wurde sofort in Agar eingebettet und Gefrierschnitte davon hergestellt, die dann nach *Blochs* Vorschrift 24 Stunden in 0,1 proz., mit Na_2HPO_4 und KH_2PO_4 gepufferter Dopalösung gebadet wurden.

[1]) *Miescher*, Arch. f. Dermat. u. Syphil. **124**, 129, 1917.

Die gewaschenen und entwässerten Präparate zeigten unter dem Mikroskop einen tiefdunklen Streifen unter der Cutis, der sich bei stärkerer Vergrößerung in gekörntes Pigment auflösen ließ. Die getroffenen Haarbulbi zeigten ebenfalls die aus *Blochs* Veröffentlichungen bekannte Reaktion. Im Längsschnitt getroffene Haare wiesen weder an den hellen, noch an den dunklen Stellen eine Verfärbung im Sinne der Dopareaktion auf. Die Papillen waren nicht gefärbt. Auch nach *van Gieson* gefärbte Schnitte eines früher exzidierten Stückes Kopfhaut boten, wie *Hoepke* beschreibt, keinen von der Norm abweichenden Befund. Im Haarboden eines rothaarigen Menschen konnte die Dopareaktion nicht angestellt werden. Vielleicht sind von ihr weitere Aufschlüsse zu erwarten.

Für das Ringelhaar kommt nach diesem Ergebnis eine intermittierende Dopaoxydasewirkung als Ursache der Ringelung nicht in Betracht.

Es bleibt noch die andere Möglichkeit: daß das Pigment bzw. eine Zwischenstufe wieder zu einem farblosen Produkt weiteroxydiert bzw. reduziert werde.

Für das Melanin ist das nichts Ungewöhnliches. *Mieschers* Versuche ergaben, daß in die Haut eingespritztes, künstlich hergestelltes Dopamelanin nach kurzer Zeit völlig verschwand; er nimmt an, daß die Epidermiszellen imstande seien, Pigment selbständig abzubauen. Derselbe Vorgang wäre hier, nur gesteigert und intermittierend anzunehmen. Oder auch das Keratin wäre wie das Chitin befähigt, Pigmentvorstufen farblos zu speichern (*Hasebroek*), und die Umwandlung wäre durch irgendwelche Umtsände intermittierend.

Eine Oxydation kommt bei diesem Prozeß kaum in Frage. *Unna* zeigte, daß das im Haarschaft aufsteigende Pigment frei von allem disponiblen Sauerstoff ist, weil es mit den stark reduzierenden Hornzellen emporsteigt. Ob dieses pathologische Haar doch reduzierende Kraft besäße, war durch den Versuch zu entscheiden, ob Methylenblau entfärbt wurde. Zu diesem Zwecke wurde Ringelhaar mit Quarzsand fein verrieben und das Pulver zu einer ganz verdünnten Methylenblaulösung hinzugefügt. Ein nach 24 Stunden vorgenommener Farbvergleich der ursprünglichen Lösung mit der Versuchsflüssigkeit ergab nicht die geringste Spur einer Entfärbung.

So kann die Möglichkeit einer Reduktion im Haarschaft abgelehnt werden, da ja bei dem für tot angesehenen Haar eine solche intermittierende Tätigkeit etwas sehr Unwahrscheinliches wäre. Allerdings scheint nach *Frieboes'*[1]) Arbeiten das Haar doch nicht die tote Materie zu sein, für die es angesehen wird; denn es gelang ihm, im Haarschaft

---

[1]) *Frieboes*, Zeitschr. f. Anat. u. Entw.-Gesch. **61**, 152, 1921.

Zellgrenzen und Kerne nachzuweisen. Wir müssen aber wohl annehmen, daß der zur Ringelung führende Prozeß sich schon bei der Bildung des Haares abspielt.

Immerhin wäre auch mit dieser Annahme noch keine einwandsfreie Erklärung für die Vermehrung des Tyrosins im Ringelhaar gegeben. Denn es ist noch nie gelungen, mittels der *Millon*schen Reaktion Tyrosin in gereinigtem Pigment nachzuweisen. Mit Recht weisen aber *v. Fürth* und *Przibram* darauf hin, daß ein derselben Reinigungsbehandlung wie Melanin unterworfenes Tyrosin diese Reaktion auch nicht mehr gibt.

Die Tryptophanbestimmungen ergaben einen gleichmäßigen geringen Bestand von fast 1 Proz. bei Haaren aller Färbungen. Dieser Befund steht im Widerspruch zu *Fasals* Angabe, der in Haaren kein Tryptophan nachweisen konnte. Wahrscheinlich ist es erst durch die Ermöglichung der direkten Bestimmung im Hydrolysat gelungen, den geringen Gehalt der Haare zu erfassen, wie ja auch *v. Fürth* 1,2 Proz. Tryptophan findet.

Weiteren Einblick in die Beziehungen zwischen Tyrosin und Pigment konnte man sich von der Analyse des in den Ringelhaaren eingeschlossenen Gases versprechen.

Die Methode, das Gas zu isolieren, war folgende: Lufttrockenes Haar wurde nach sorgfältigster Entfettung in einem kleinen weithalsigen Erlenmeyer mit H_2O gekocht, dann wurde das Wasser entfernt, durch 70proz. SO_4H_2 ersetzt und die Haare im Vakuum von etwa äußerlich anhaftender Luft befreit. Der kleine Erlenmeyer wurde in ein weites, mit entlüfteter 70proz. SO_4H_2 gefülltes Becherglas übergeführt und in diesem unter der Oberfläche der Flüssigkeit umgekehrt. Etwa aufsteigendes Gas mußte sich dann in der Kuppel des kleinen Erlenmeyer sammeln.

Während in dem mit normalem (schwarzem) Haar beschickten Kontrollversuche — selbst nach wochenlangem Stehen — keinerlei Gasentwicklung zu bemerken war, zeigten sich die einzelnen Ringelhärchen nach wenigen Tagen, soweit sie durch die kalte Hydrolyse angegriffen waren, mit feinsten Bläschen besetzt, die aufstiegen und sich nach 14 Tagen in einer großen Blase gesammelt hatten.

Diese Blase wurde in mehreren Teilen in den *Krogh*schen[1]) Apparat zur Mikrogasanalyse übergeführt und dort O_2 und CO_2 mittels Absorption bestimmt. Der verbleibende Gasrest konnte mangels einer Verbrennungsapparatur nicht weiter differenziert werden.

Eine im Monat September 1922 (Augusthaar) untersuchte Blase zeigte einen O_2-Gehalt von 5,67 Proz. O_2 und 1,99 Proz. CO_2, eine zweite 2,21 Proz. CO_2 und 6 Proz. O_2.

---

[1]) *Krogh*, Mikrogasanalyse, Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden.

Tabelle IV.

	Vol.-Proz. O_2	Vol.-Proz. CO_2	Rest
I.	5,63	1,92	92,55
II.	5,56	1,87	92,43
III.	5,14	2,24	92,62

Nach diesen Ergebnissen ist wohl die Annahme, daß das in den Ringelhaaren eingeschlossene Gas durch Diffusion hineingewandert sei, abzulehnen. Die Alveolenluft enthält nach *Bohr*[1]) 14,6 Proz. O und 5,6 Proz. CO_2, so daß auch ein direktes Übergehen von Körpergasen nicht in Frage kommt. Wenn man auch dem verminderten O_2-Gehalt keine zu große Bedeutung beilegen darf, da ja die gashaltige Kammer von resorbierendem Gewebe umgeben ist, so deutet die Erhöhung des CO_2-Gehalts auf einen Oxydationsprozeß hin.

Was für ein Vorgang sich hierbei abspielt und in welcher Beziehung die Tyrosinvermehrung zu der intermittierenden Gasbildung und Entfärbung steht, ist zurzeit nicht zu entscheiden. Jedenfalls deuten aber die Versuche darauf hin, daß ein enger genetischer Zusammenhang zwischen Tyrosin und Pigment besteht.

Zusammenfassung.

1. Die von *Mörner* und *Buchtala* vertretene Ansicht, daß sämtlicher Schwefel des Haares als Cystinschwefel gebunden sei, wird durch Bestimmungen des Cystins nach der *Folin*schen Methode für normales Haar bestätigt. Eine Ausnahme macht das rote Haar, in dem mehr Schwefel vorhanden ist, als sich aus dem gefundenen Cystinwert berechnen läßt.

2. Irgendwelche Abhängigkeit der Färbung der Haare vom Schwefel- oder Cystingehalt ließ sich nicht feststellen.

3. Der Tyrosingehalt, der normalerweise mit etwa 4,3 Proz. gefunden wurde, zeigt bei roten und Ringelhaaren eine Vermehrung bis 5,3 bzw. 6,2 Proz. Vielleicht ist dieser Befund in Parallele mit der schlechten Pigmentbildung der rothaarigen Menschen zu setzen und deutet auf eine mangelhafte Oxydationsfähigkeit hin.

4. Dieser Befund — bei mangelhafter Oxydation bzw. bei Verminderung des Pigments um die Hälfte wie beim Ringelhaar — läßt auf einen genetischen Zusammenhang zwischen Tyrosin und Melanin schließen.

5. Ein spezifischer Ernährungsversuch mit Humagsolan ergab bei Ringelhaaren nur bei Cystin eine deutliche Vermehrung. Die auf-

[1]) *Bohr*, zitiert nach *Landois-Rosemann*, Lehrb. d. Physiol. 1919.

fällig dünnen, weißblonden Haare eines Kindes mit alimentärem Ödem wiesen dagegen einen Tyrosingehalt von nur 3,8 Proz. und nur 0,6 Proz. Tryptophan auf. Das Haar scheint nach diesen Ergebnissen jedenfalls stärker am Stoffwechsel beteiligt zu sein als gemeinhin angenommen wird.

6. Im Haarboden des Ringelhaares ergab die Dopareaktion nichts, was auf eine intermittierende Pigmentbildung schließen ließ.

7. Das Gas in den lufthaltigen Kammern des Ringelhaares enthielt etwa 5,4 Proz. O_2 und 2 Proz. CO_2. Die Vermehrung des CO_2 läßt auf einen Oxydationsprozeß schließen, dessen Natur jedoch auch durch diese Untersuchungen ungeklärt bleibt.

Über die Mikrobestimmung des Traubenzuckers nach dem Verfahren von I. Bang.

Von

Erich Cohn und **Alfred Wagner.**

(Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 25. April 1925.)

Das normale menschliche Blut führt nur außerordentlich kleine Mengen von Traubenzucker, die sich auch in pathologischen Fällen nur zu einem Bruchteile derjenigen Zuckerkonzentrationen steigern, die man in eben diesen Fällen im Harn anzutreffen pflegt. Trotzdem ist es für den Physiologen wie für den Kliniker von der größten Bedeutung, gerade den Zuckergehalt des Blutes verfolgen zu können. Angesichts der vielfachen Bedeutung, die der Traubenzucker für das physiologische Geschehen im Körper hat, sagen uns schon kleine Schwankungen unter Umständen Wichtiges für den Ablauf der normalen Funktionen des Organismus aus. Für den Kliniker andererseits ist es von Bedeutung, seiner Diagnose, Prognose und Therapie direkt die Verhältnisse innerhalb des Blutes und nicht etwa die innerhalb der Exkrete zugrunde zu legen; denn gerade beim Zucker ist es nicht möglich, von der Konzentration im Harne auf die im Blute zu schließen, also den Erfolg irgendwelcher therapeutischer Eingriffe ausschließlich nach dem Harnbefunde maßgebend zu beurteilen. Ganz undenkbar wäre die Insulintherapie ohne eine gleichzeitige Kontrolle der Schwankungen im Blutzuckergehalt. Die oben erwähnten niedrigen Konzentrationen des Blutzuckers und die Notwendigkeit, vor der Analyse das Eiweiß des Blutes zu entfernen, bedingten die Verwendung sehr großer Blutvolumina zu jeder Analyse, solange man auf die bei der Harnuntersuchung übliche Methodik angewiesen war. So hat man zwar über die wichtigsten physiologischen Funktionen und Schicksale des Traubenzuckers, denen man mit verhältnismäßig wenigen Untersuchungen bei-

kommen konnte, schon seit längerer Zeit Klarheit gewonnen. Anders dagegen stand es auf klinischem Gebiete, wo der Notwendigkeit häufiger Blutanalysen an derselben Person die Undurchführbarkeit ständig wiederholter ausgiebiger Blutentziehungen gegenüberstand. Wenngleich es nicht an Versuchen gefehlt hat, den Maßstab der Blutanalyse zu verkleinern, so ist eine vollständige Beseitigung des geschilderten Zwiespaltes erst gelungen durch die Mikromethodik von *Bang*, bei der wenige Tropfen Blutes, die aus der Fingerbeere entnommen werden können, hinreichen, um die Menge des Zuckers zu bestimmen.

In ihrer ursprünglichen Form wurde die Zuckerbestimmung nach *Bang* so vorgenommen, daß die auf Papierblättchen eingetrockneten Blutmengen mit einer schwach angesäuerten uransalzhaltigen Chlorkaliumlösung extrahiert wurden, daß darauf bei alkalischer Reaktion eine Reduktion von Kupfersalz durch den Zucker vorgenommen und das reduzierte Kupfer jodometrisch bestimmt wurde. Die näheren Anweisungen, die *Bang* zur Ausführung dieser Methode gibt, verraten, wo ihre Hauptfehlerquellen liegen. Die Erhitzung mußte mit einer Flamme von ganz bestimmter Wirksamkeit während einer ganz genau festgelegten Zeit durchgeführt werden. Sofort nach Beendigung des Kochens wurde in einer besonderen Vorrichtung für Abschluß der Außenluft gesorgt. Es geht daraus hervor, daß eine Veränderung der Alkalinität durch zu starkes Einengen die Versuchsergebnisse verändern konnte, während andererseits das gebildete Kupferoxydul gegen die Luftoxydation geschützt werden mußte. Trotz dieser Schwäche hat die Methode in physiologischen und klinischen Laboratorien gute Aufnahme gefunden und z. B. in der Hand von *Henriques* und *Ege*[1]) der Analyse minutiöser physiologischer Vorgänge gedient. Trotzdem hat *Bang* sie selbst durch ein anderes Verfahren ersetzt, das weniger empfindlich gegen äußere Einflüsse, aber immerhin ebenso genau ist. Bei diesem wird die Heizung der Analysenflüssigkeit indirekt durch einen Wasserdampfstrom bewirkt, und ferner ist das Reagens, mit dessen Hilfe die Ermittlung des reduzierten Anteils des Kupfers erfolgt, nämlich Jodsäure, von vornherein in der Versuchsflüssigkeit enthalten, so daß sie sofort im Augenblick der Reaktionsumstellung durch Ansäuern mit Schwefelsäure zu wirken beginnt[2]). Besonders in dieser zweiten Form hat das Verfahren von *Bang* sich allenthalben in klinischen Laboratorien eingeführt und ist zu einem unentbehrlichen Hilfsmittel bei der Behandlung des Diabetes geworden. Trotzdem nun melden sich immer wieder Stimmen, die die Brauchbarkeit der Methode und die

---

[1]) *Henriques* und *Ege*, diese Zeitschr. **119**, 121, 1921.

[2]) Inzwischen ist die Fehlerquelle der Luftoxydation durch das ausgezeichnete Verfahren von *Hagedorn* (diese Zeitschr. **135**, 46, 1923) ausgeschaltet worden.

Zuverlässigkeit der von ihr gelieferten Ergebnisse anzweifeln. So wandte *Oppler*[1]) ein, daß das von *Bang* angegebene Thiosulfatäquivalent des Traubenzuckers von 2,8 nur bei Verwendung von etwa 0,5 mg Glucose Geltung hat und sich beim Abgehen von dieser Größenordnung deutlich ändert. Schon Temperaturdifferenzen im Arbeitsraume, Schwankungen im Gasdruck usw. sollten das Äquivalent ebenfalls verändern. *Cohen-Tervaert*[2]) machte Versuche mit wechselnden Erhitzungszeiten und fand auch bei einer Dauer von 4 Minuten wechselnde Werte, konnte andererseits einen Mittelwert für das Äquivalent errechnen und gibt dafür die Zahl 2,2 an. *Petschacher*[3]) endlich ermittelte für das Verhältnis Thiosulfat: Traubenzucker außerordentlich schwankende Werte, so z. B. an einem Tage 1,96, 2 Tage später 1,74, und gibt an, daß die Ursache für das starke Schwanken seiner Ergebnisse in dem wechselnden Barometerstande, in der Dampfspannung der Luft und ihrer Ionisation zu suchen sei. *Petschacher* betont in seiner ersten Arbeit, daß die Fehler hauptsächlich bei Werten unter 0,3 mg Glucose zum Ausdruck kommen, also solchen, mit denen man es bei Verwendung von 100 bis 150 mg Blut hauptsächlich zu tun hat, und opfert in einer neuen Arbeit[4]) den Vorteil der Blutentnahme aus der Fingerbeere zugunsten der Venenpunktion, um eine größere Blutmenge in eine der *Bang*schen nachgebildete Versuchsordnung einführen zu können. Angesichts der außerordentlichen Bedeutung, die gerade jetzt in der Zeit der lebhaftesten Arbeit mit Insulin eine zuverlässige Mikrobestimmung des Traubenzuckers besitzt, ist es von größter Wichtigkeit, daß das wohlbegründete Vertrauen der Physiologen und Kliniker zu einer Standardmethode, wie es die Blutzuckerbestimmung nach *Bang* geworden ist, nicht erschüttert wird. Die Angaben *Bangs* müssen daher, so sehr sie an und für sich uneingeschränktes Vertrauen verdienen, nachgeprüft werden, um zuzusehen, ob die erwähnten Einwendungen berechtigt sind.

Und noch eine andere Gruppe von methodischen Bearbeitungen der Blutzuckerbestimmungen muß berücksichtigt werden; das sind diejenigen, die das *Bang*sche Verfahren zwar als zuverlässig anerkennen, aber eine Reihe von Abänderungen daran vornehmen zu müssen glauben. Derartige Abänderungen mögen durch die individuellen Verhältnisse einzelner Laboratorien notwendig oder erwünscht erscheinen, ihre Häufung ist aber geeignet, das Arbeiten nach den klaren und bündigen Vorschriften *Bangs* zu erschweren und den Anfänger zu verwirren. Derartige kleine Abänderungen macht z. B. *Richter-Quittner*[5]), die im

[1]) *Oppler*, Zeitschr. f. phys. Chem. **109**, 57, 1920.
[2]) *Cohen-Tervaert*, ebendaselbst **110**, 41, 1920.
[3]) *Petschacher*, diese Zeitschr. **131**, 116, 1922.
[4]) Derselbe, ebendaselbst **142**, 370, 1923.
[5]) *Richter-Quittner*, ebendaselbst **96**, 92, 1919.

Gegensatz zur Vorschrift mit 3 ccm Blut bzw. Plasma arbeitete, um eine bessere Übereinstimmung mit den Vergleichswerten der *Bertrand*schen Makromethode zu erzielen. *Labbé, Nepveux* und *Nomidis*[1]) stellten die wechselnde Reduktionsfähigkeit verschiedener Chlorkaliumpräparate fest. Sie erneuern die saure Jodatlösung alle 3 bis 4 Tage, ohne jedoch hierfür einen besonderen Grund anzugeben. Eine Ausnahme macht hier natürlich das von *Hagedorn* angegebene Verfahren, das auf einer anderen chemischen Grundlage beruht, da *Hagedorn* zur Zuckerbestimmung die Umwandlung von Kaliumferricyanid zu dem gegen den Luftsauerstoff unempfindlichen Kaliumferrocyanid benutzt. Diese Methode liefert ganz ausgezeichnete Werte und erwies sich gleich der *Bang*schen als übereinstimmend mit der Titration nach *Bertrand*.

Aus den oben angeführten Gründen haben wir es unternommen, das zweite *Bang*sche Verfahren genau in der Form, wie sie der Autor angibt, auf seine Zuverlässigkeit bei den im Blute gewöhnlich vorhandenen Zuckerkonzentrationen und auf die Grenzen seiner Genauigkeit zu prüfen. Wir geben nachstehend eine Schilderung des Verfahrens, wie wir es ausführten, bei der wir einige Kunstgriffe betonen, die *Bang* nicht ausdrücklich erwähnt. Selbstverständlich ist der größte Wert auf reine Reagenzien zu legen, wir sind aber meistens mit den besten Präparaten des Handels — nur das Kaliumjodat stellten wir nach *Bangs* Vorschrift selbst her — zu konstanten und richtigen Ergebnissen gelangt. Speziell die Chlorkaliumpräparate der Firma Kahlbaum fanden wir zwar nicht frei von reduzierenden Stoffen, aber konstant in ihrem Gehalt, so daß unsere Leerwerte sich kaum änderten. Die saure Kupferjodatlösung fanden wir 5 bis 6 Wochen haltbar, wenn sie kühl aufbewahrt wurde, und haben bei unseren eigenen Lösungen, die in dieser Zeit verbraucht zu werden pflegen, niemals beobachtet, daß sie zur Bestimmung von Zucker unbrauchbar wurden. Es ist dringend anzuraten, zur Erlangung einwandfreier Resultate mit Normalpipetten zu arbeiten, wenigstens soweit es sich um die in der Dosierung empfindlichen Lösungen handelt. Das Auslaugen der Plättchen und die Mischung der Reaktionsflüssigkeiten nahmen wir genau in der von *Bang* angegebenen Weise vor. Nicht ganz ohne Bedeutung ist die Heizung des Dampfentwicklungskolbens, zu der wir einen gewöhnlichen, kräftigen Bunsenbrenner am geeignetsten fanden. Bei Verwendung zu starker Brenner (große Teclu- oder Ringbrenner) wurden die Resultate gelegentlich zu hoch oder durch Verspritzen zu niedrig. Die Erhitzungszeit betrug immer genau 4 Minuten. Von besonderer Bedeutung ist die Art der Unterbrechung des Siedens. Wir senken nach Abschluß der Kochzeit das Kochgefäß so weit, daß das Dampfrohr aus der Flüssig-

[1]) *Labbé, Nepveux, Nomidis,* Journ. de pharm. et de chimie **26**, 49, 1922.

keit herausragt, aber der obere Teil der Flasche noch von Wasserdampf durchströmt wird, geben dann die Schwefelsäure zu und schwenken gelinde. Dabei entwickelt sich reichlich Kohlensäure, die zusammen mit dem Wasserdampfe einen wirksamen Schutz gegen etwaige Luftoxydation bilden dürfte. Die weitere Abkühlung und Verdünnung der Flüssigkeit, Freisetzung und Titration des Jods führten wir wieder genau nach *Bangs* Vorschrift aus, deren Wiederholung sich wohl erübrigt. Unsere ersten Versuche nahmen wir an einer Zuckerlösung vor, deren Konzentration durch Polarisation und Titration nach *Bertrand* festgestellt wurde. Von dieser Stammlösung, die wir jeden Tag frisch herstellten und kontrollierten, stellten wir passende Verdünnungen her und maßen von ihnen bestimmte Mengen ab. Die Bestimmung wurde mehrmals, in der Regel vier- bis sechsmal gemacht und an mehreren, häufig längere Zeit voneinander entfernten Tagen wiederholt. Gelegentlich ließen wir Kontrollbestimmungen von anderen Angehörigen des Laboratoriums ausführen. Wir geben nunmehr im folgenden unsere Reihenversuche in absteigenden Konzentrationen wieder.

1 ccm einer 0,01 proz. Traubenzuckerlösung (= 0,1 mg Zucker).

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,4	3,4	3,4

Vollbestimmung:

2,85	2,86	2,85	2,85
0,098	0,100	0,098	0,098 mg

1 ccm einer 0,005 proz. Traubenzuckerlösung (= 0,05 mg Zucker).

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,44	3,42	3,43

Vollbestimmung:

3,14	3,12	3,14	3,16
0,051	0,055	0,051	0,048 mg

1 ccm einer 0,0025 proz. Traubenzuckerlösung (= 0,025 mg Zucker).

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,42	3,44	3,43

Vollbestimmung:

3,26	3,32	3,26	3,30	3,30
0,030	0,019	0,030	0,023	0,023 mg

28. Februar 1924. 0,1 mg Zucker.
Stammlösung 1 Proz., kontrolliert nach Bertrand = 1 Proz.

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,64	3,65	3,645

Vollbestimmung:

3,07	3,08	3,09	3,08
0,103	0,100	0,099	0,100 mg

0,05 mg Zucker.

Vollbestimmung:

3,36	3,37	3,37	3,36
0,050	0,049	0,049	0,050 mg

10. März 1924. 0,025 mg Zucker.
Stammlösung 0,5 Proz., kontrolliert nach Bertrand = 0,5 Proz.

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,60	3,62	3,61

Vollbestimmung:

3,50	3,41	3,47	3,49
0,0196	0,0257	0,0250	0,0214 mg

11. März 1924. 0,025 mg Zucker.
Stammlösung 0,5 Proz., kontrolliert durch Polarisation = 0,5 Proz.

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,63	3,62	3,625

Vollbestimmung:

3,48	3,53	3,49	3,50
0,0259	0,016	0,023	0,0223 mg

12. März 1924. 0,04 mg Zucker.
Stammlösung 1 Proz., kontrolliert nach Bertrand = 1 Proz.

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,69	3,67	3,68

Vollbestimmung:

3,45	3,43	3,45	3,44
0,041	0,045	0,041	0,042 mg

13. März 1924. 0,05 mg Zucker.
Stammlösung 0,5 Proz., kontrolliert nach Bertrand = 0,5 Proz.

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,58	3,56	3,57

Vollbestimmung:

3,28	3,28	3,29	3,28
0,050	0,050	0,050	0,050 mg

14. März 1924. 0,025 mg Zucker.
Stammlösung 0,5 Proz., kontrolliert durch Polarisation = 0,5 Proz.

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,65	3,68	3,665

Vollbestimmung:

3,54	3,53	3,49	3,50
0,0223	0,023	0,030	0,028 mg

17. März 1924. 0.03 mg Zucker.
Stammlösung 1 Proz., kontrolliert durch Polarisation = 1 Proz.

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,70	3,68	3,69

Vollbestimmung:

3,53	3,52	3,54	3,53
0,028	0,030	0,0268	0,0285 mg

18. März 1924. 0,04 mg Zucker.
Stammlösung 2 Proz., kontrolliert nach Bertrand = 2 Proz.

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,66	3,68	3,67

Vollbestimmung:

3,47	3,44	3,45	3,45
0,0357	0,041	0,039	0,039 mg

24. März 1924. 0.03 mg Zucker.
Stammlösung 1 Proz., kontrolliert nach Bertrand = 1 Proz.

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,67	3,67	3,67

Vollbestimmung:

3,49	3,50	3,53	3,51
0,032	0,030	0,025	0,028 mg

25. März 1924. 0 04 mg Zucker.
Stammlösung 1 Proz., kontrolliert durch Polarisation = 1 Proz.

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,67	3,67	3,67

Vollbestimmung:

3,46	3,45	3,45	3,45
0,0375	0,039	0,039	0,0385 mg

27. März 1924. 0 035 mg Zucker.
Stammlösung 1 Proz., kontrolliert durch Polarisation = 1 Proz.

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,62	3,64	3,63

Vollbestimmung:

3,44	3,43	3,40	3,43
0,034	0,0357	0,041	0,0367 mg

29. März 1924. 0,035 mg Zucker.
Stammlösung 1 Proz., kontrolliert nach Bertrand = 1 Proz.

Leerbestimmung:

I	II	Mittel
3,59	3,61	3,60

Vollbestimmung:

3,40	3,39	3,40	3,40
0,0357	0,0375	0,0357	0,036 mg

Es dürfte zwecklos sein, sämtliche Bestimmungen, die wir zu den verschiedensten Jahres- und Tageszeiten unter den verschiedensten Temperatur- und Witterungsbedingungen ausgeführt haben, wiederzugeben. Wir greifen nur zwei von den Serien heraus, die unternommen wurden, um die Grenze zu ermitteln, bis zu der herab die Zuckerbestimmungen zuverlässig sind. Zwischen beiden Bestimmungen fällt als bedeutender Unterschied auf, daß die Leerwerte, die zwar in jeder einzelnen Serie nahezu konstant sind, untereinander um 0,2 ccm differieren. Die Ergebnisse beider Versuchsreihen zeigen, daß auch derartige Differenzen, wie sie durch die Herstellung der Normallösungen oder durch die Anwendung eines neuen Präparats unter den Versuchschemikalien sehr leicht zustande kommen können, die Ergebnisse der Analysen relativ wenig berühren. Im allgemeinen haben unsere Versuche gezeigt, daß bis herab zu einer Zuckermenge von 0,035 ccm brauchbare Werte erhalten werden. Hier fallen natürlich kleine Titrationsdifferenzen außerordentlich stark ins Gewicht, und man wird in solchen Fällen, wo man Zuckermengen dieser kleinen Größenordnung zu erwarten oder in einer ersten Bestimmung gefunden hat, entweder eine besonders große Zahl von Parallelbestimmungen anstellen oder mit etwas stärkeren Blutmengen arbeiten (150 mg).

Um nicht zu leicht in diesen niedrigen Bereich hineinzugeraten, möchten wir unbedingt empfehlen, Blutproben, die ein Gewicht von unter 100 mg zeigen, nur aufzuarbeiten, wenn man über sehr große Übung verfügt. Geeignete Blutmengen sind leicht zu erhalten und werden immer erreicht, wenn das Blut mit der erforderlichen Intensität fließt. Es kann nicht dringend genug von dem Versuch abgeraten werden, von einem nur träge blutenden Einstich eine größere Menge von Plättchen befeuchten zu lassen. Konzentrationen von 0,035 Proz. Zucker wurden früher bei der Untersuchung menschlichen und auch tierischen Blutes nur in ganz seltenen Ausnahmefällen gesehen, dürften aber heutzutage in Verbindung mit der Insulintherapie und beim hypoglykämischen Symptomenkomplex häufiger zur Beobachtung gelangen. Bei Verwendung von 150 mg Blut wird man noch Traubenzuckermengen von 0,025 Proz. sicher erfassen können, die

wohl die untere Grenze derjenigen Zuckerkonzentrationen darstellen, die praktisches Interesse für den Kliniker besitzen.

Wir haben im Laufe unserer Arbeit immer wieder den Eindruck gewonnen, daß das zweite *Bang*sche Verfahren die Menge der reduzierenden Substanz, die in die Salzlösung übergeht, absolut richtig wiedergibt, und möchten aus diesem Grunde davon abraten, an den *Bang*schen Vorschriften irgendwelche Modifikationen anzubringen. (In dem von uns angewendeten kleinen Kunstgriffe sehen wir eine solche nicht.) Wir möchten sogar auch vor übergroßer Ängstlichkeit bei der Herstellung der Lösungen abraten. Wo sich bei uns oder anderen Mitgliedern des hiesigen Laboratoriums bei den Zuckerbestimmungen einmal Unstimmigkeiten ergeben, lag bei näherer Prüfung ihre Ursache meist nicht in den Lösungen. Natürlich wollen wir nicht einer Außerachtlassung der von *Bang* angegebenen Vorsichtsmaßregeln das Wort reden. Zusammenfassend bemerken wir, daß das zweite Reduktionsverfahren von *Bang* in der vom Autor selbst ihm gegebenen Form in bezug auf Genauigkeit und Unempfindlichkeit gegen Störungen alle Ansprüche erfüllt, die der Kliniker und Physiologe stellen muß.

Über Anaerobiose von Tumorgewebe.

Von

Yohichi Okamoto (Tokio).

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 23. April 1925.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

Nach den Arbeiten, die in diesem Institut über den Stoffwechsel der Tumoren ausgeführt worden sind[1]), lag die Annahme nahe, daß Tumorgewebe unter anaeroben Bedingungen leben kann. Ich habe es auf Vorschlag von Herrn *Otto Warburg* unternommen, diese Annahme zu prüfen.

Tumorschnitte von einigen $^1/_{10}$ mm Dicke wurden in Ringerlösung oder Serum gebracht und unter Durchlüftung mit einem Kohlensäurestickstoffgemisch im Brutschrank gehalten. Nach einem oder mehreren Tagen wurden die Schnitte auf Versuchstiere transplantiert. Der Erfolg der Transplantation entschied darüber, ob das Gewebe zur Zeit der Transplantation noch lebte.

Daneben habe ich auch Stoffwechselmessungen mit Tumorgewebe ausgeführt und habe verfolgt, wie sich der Stoffwechsel ändert, wenn das Gewebe unter verschiedenen Bedingungen im Brutschrank gehalten wird.

I. Das Versuchsmaterial.

Zu den Versuchen verwendete ich das *Flexner-Jobling*sche Rattencarcinom, das *Jensen*sche Rattensarkom und das *Rous*sche Hühnersarkom. Das *Jensen*sche Rattensarkom verdankt das Institut Herrn Dr. *W. Cramer* vom Imperial Cancer Institut in London, das *Rous*-Sarkom Herrn Dr. *Peyton Rous* vom Rockefeller-Institut in New-York.

Zur Transplantation wurden kleine Tumorstückchen mit der Pinzette in eine Hohlnadel gedrückt. Die Hohlnadel wurde unter die Rückenhaut (Rattencarcinom und Rattensarkom) oder in den Brust-

---

[1]) Diese Zeitschr. **142**, 317, 1923; **142**, 334, 1923; **152**, 309, 1924; Klin. Wochenschr. 1925, 4. Jahrg., Nr. 12.

muskel (Hühnersarkom) eingestochen, ihr Inhalt mit einem Draht herausgestoßen. Hierbei ging frisches Material des Rattencarcinoms mit einer Ausbeute von 50 bis 100 Proz., des Ratten- und Hühnersarkoms mit einer Ausbeute von 80 bis 100 Proz. an.

Unter „Angehen“ verstehe ich das Heranwachsen eines Tumors zu mindestens Kirschkerngröße im Laufe von 4 Wochen. Länger als 4 Wochen wurde nicht beobachtet. Zu bemerken ist, daß einmal herangewachsene Rattencarcinome niemals wieder zurückgingen, während es häufig vorkam, daß sich *Jensen*sche Sarkome zurückbildeten, sei es, daß sie von frisch entnommenem Tumormaterial, sei es, daß sie von irgendwie vorbehandeltem Material stammten.

II. Anordnung der Versuche.

Die Anordnung veranschaulicht Abb. 1. *K* sind die „Durchlüftungskolben“, die in dem auf 37° regulierten Brutschrank B stehen, V sind Wattestopfen. Das Volumen der Kolben beträgt etwa 500 ccm,

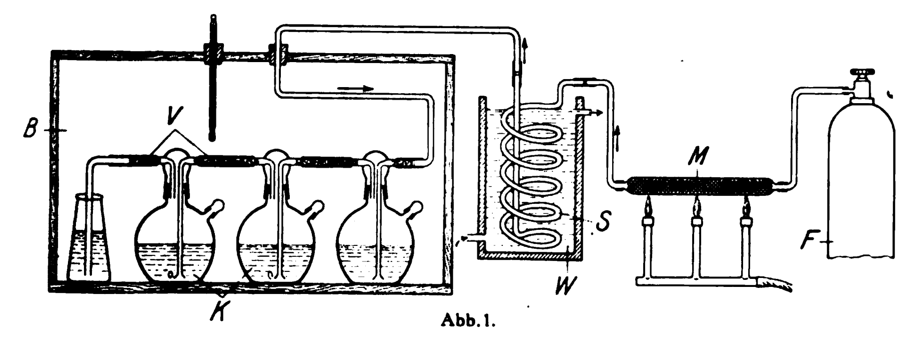


Abb. 1.

das Volumen der eingefüllten Flüssigkeit — Ringerlösung oder Serum — 250 ccm. *S* ist eine Kühlschlange, durch *W* fließt kaltes Wasser. *M* ist ein Muffelofen, in dem metallisches Kupfer auf Rotglut erhitzt ist. *F* ist eine Stahlflasche, die 5 Proz. Kohlensäure in Stickstoff enthält. Soll unter aeroben Bedingungen gearbeitet werden, so enthält die Stahlflasche 5 Proz. Kohlensäure in Sauerstoff, Muffelofen und Kühlschlange fallen dann fort.

Das aus dem Muffelofen austretende Gasgemisch war so weit frei von Sauerstoff, daß gasanalytisch nach *Haldane* kein Sauerstoff mehr nachweisbar war. Sättigte man mit dem Gasgemisch Atmungströge, die ein Gewebestück enthielten, so wurden negative Drucke nicht beobachtet. Unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen der manometrischen Atmungsmessung beweist dies, daß bei dem in dem Gasgemisch herrschenden Sauerstoffdruck weniger als der hundertste Teil des Gewebes atmete, oder daß der Sauerstoff nur noch in Schnittiefen eindrang, die weit unter der Dicke einer Zelle lagen.

Ich bin also berechtigt, die Bedingungen, unter denen ich gearbeitet habe, als anaerob zu bezeichnen, während es physikalisch unrichtig wäre, meine Lösungen als frei von Sauerstoff zu bezeichnen.

Ich habe große Kolben, große Flüssigkeitsmengen und kleine Gewebemengen — einige Milligramme — verwendet, um eine Veränderung der Flüssigkeiten durch den Stoffwechsel des Gewebes nach Möglichkeit zu vermeiden. Ich habe ferner darauf geachtet, daß der Bicarbonatgehalt meiner Flüssigkeiten der physiologische war, und es dadurch erreicht, daß ich — bei Durchlüftung mit 5 Proz. Kohlensäure — bei dem physiologischen p_H gearbeitet habe.

Alle Versuche habe ich unter aseptischen Maßregeln angestellt. Zur Prüfung, ob die Maßregeln erfolgreich gewesen waren, wurde nach Beendigung der Versuche der Inhalt der Kolben *K* bis auf einen kleinen Rest ausgegossen. Dann wurde Nährbouillon zugesetzt und nach 24 Stunden geprüft, ob eine Trübung eingetreten war. Nur über Versuche, in denen die Nährbouillon klar blieb, ist im folgenden berichtet.

III. Herstellung der Lösungen.

Sterile Bicarbonatlösung. Da sowohl festes als auch gelöstes Bicarbonat sich bei den zur Sterilisation erforderlichen Temperaturen zersetzt, so habe ich zur Bereitung steriler Bicarbonatlösungen einen Umweg eingeschlagen.

0,82 g wasserfreien Natriumcarbonats wurden in einem Durchlüftungskolben (*K* der Abb. 1) bei 170° trocken sterilisiert. Dann wurden 100 ccm Wasser, das im *Koch*schen Dampftopf 1 Stunde erhitzt war, zugegeben und durch die Lösung unter häufigem Schütteln 40 Minuten lang ein kräftiger Strom 100proz. Kohlensäure durchgeleitet. Hierbei wurde das Carbonat in Bicarbonat übergeführt und die Lösung mit Kohlensäure gesättigt. Um die Konzentration der gelösten Kohlensäure auf ihr physiologisches Maß zu bringen, wurde noch 10 Minuten lang 5 Proz. Kohlensäure in Sauerstoff oder Stickstoff durchgeleitet. Zur Aufbewahrung verschloß ich das Gaseinleitungs- und Ableitungsrohr mit Gummistopfen.

Da das Molekulargewicht des Natriumcarbonats 106, des Natriumbicarbonats 84 ist und zwei Moleküle Bicarbonat aus einem Molekül Carbonat entstehen, so war der Prozentgehalt der so bereiteten Lösung an Bicarbonat:

$$0{,}82 \cdot \frac{2 \cdot 84}{106} = 1{,}3.$$

Eine solche Lösung ist dem Rattenserum isoton.

Sterile Glucoselösung. 5,6 g Glucose, gelöst in 100 ccm Wasser, wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen je eine Viertelstunde lang im *Koch*schen Dampftopf erhitzt.

Eine Lösung von 5,6 g Glucose in 100 ccm Wasser ist dem Rattenserum isoton.

Sterile Salzlösung. Als „Salzlösung" bezeichne ich eine Ringerlösung, die kein Bicarbonat enthält. Zu ihrer Bereitung wurden folgende Stammlösungen vorrätig gehalten:

1. 9 g Natriumchlorid in 1000 ccm Wasser,

2. 11,5 g Kaliumchlorid in 1000 ccm Wasser,

3. 12,2 g (wasserfreies) Calciumchlorid in 1000 ccm Wasser. Man stellt diese Lösung her, indem man mehr als die berechnete Menge wasserhaltigen Calciumchlorids in einem bekannten Volumen auflöst, den Chlorgehalt durch Titration mit Silbernitrat ermittelt und die gewünschte Salzkonzentration durch Verdünnen mit der berechneten Menge Wasser erzeugt.

1000 Raumteile der Stammnatriumchloridlösung wurden mit 20 Raumteilen Kaliumchlorid- und 20 Raumteilen Calciumchloridlösung gemischt. Je 200 ccm dieser Salzlösung wurden in einen Durchlüftungskolben eingefüllt und im *Koch*schen Dampftopf einmal 1 Stunde lang sterilisiert.

Sterile zuckerhaltige Ringerlösung. 200 ccm der sterilen Salzlösung, 40 ccm der sterilen Bicarbonatlösung und 9 ccm der sterilen Glucoselösung wurden in einem Durchlüftungskolben gemischt und bei 37° mit 5 Proz. Kohlensäure in Sauerstoff oder 5 Proz. Kohlensäure in Stickstoff gesättigt. Dann war:

die Konzentration der Glucose . . . . 0,2 Proz.
„ „ an Bicarbonat . . . . $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ Mole/Liter
„ „ der freien Kohlensäure (bei einem Barometerstand von 760 mm) . . . . $1{,}18 \cdot 10^{-3}$ „

p_H nach *Henderson-Hasselbalch* $= 6{,}14 + \log \frac{2{,}5 \times 10^{-2}}{1{,}18 \times 10^{-3}} = 7{,}46.$

Blausäurehaltige Ringerlösung. 0,7 g Kaliumcyanid wurden in 100 ccm Wasser gelöst, ein aliquoter Teil mit n Schwefelsäure bis zum Umschlag von Methylorange titriert und dann der ganze Rest mit der aus der Titration berechneten Menge an n Schwefelsäure angesäuert. Von dieser etwa n/10 Blausäurelösung wurde zu der sterilen Ringerlösung so viel zugefügt, daß die Blausäurekonzentration in der Ringerlösung n/1000 wurde. Es wurde dabei angenommen, daß die n/10 Blausäurelösung keine lebenden Bakterien enthält, und wirklich blieben die auf die beschriebene Art hergestellten Lösungen steril.

Um die Abnahme der Blausäurekonzentration während des Versuchs — bei dem immer Gas durch die Kolben geleitet wurde — so klein wie möglich zu machen, wurden vor den Versuchskolben, der

die Schnitte enthielt, zwei leere Kolben geschaltet, die n/1000 Blausäure enthielten. Nach Beendigung der Versuche, die 24 Stunden dauerten, wurde das Gewebe aus der Lösung herausgenommen und der Blausäuregehalt der Lösung kontrolliert. Zu dem Zwecke wurden zu 100 ccm Lösung 2 ccm 25proz. Ammoniaks zugesetzt, von dem entstandenen Niederschlag (Calciumcarbonat) abzentrifugiert, 0,5 ccm Jodkalilösung als Indicator zugesetzt und nunmehr die Blausäure nach *Deniges*[1]) mit n/100 Silbernitrat titriert. Dabei zeigte sich, daß die Blausäurekonzentration in dem Versuchskolben im Laufe von 24 Stunden von 1×10^{-3} auf $0{,}74 \times 10^{-3}$ Molen pro Liter, also nur unwesentlich, gesunken war.

Steriles Serum. Es wäre am korrektesten gewesen, für die Versuche immer das Serum derjenigen Tierart zu verwenden, von dem der Tumor stammte. Da es jedoch schwierig und teuer war, die nötigen Mengen an Rattenserum zu erhalten, so bin ich im Laufe der Arbeit zu inaktiviertem Pferdeserum übergegangen, nachdem ich mich in Vorversuchen überzeugt hatte, daß frisches Rattenserum nicht wesentlich günstiger wirkt, als inaktiviertes Pferdeserum.

Blut von Pferden[2]) wurde im Schlachthaus in hohen sterilen Zylindern aufgefangen und über Nacht unter Beschwerung mit einem durchlöcherten Metallgewicht im Eisschrank stehengelassen. Am nächsten Morgen wurde das trübe ausgepreßte Serum in Zentrifugiergläser abgefüllt und unter Verschluß zentrifugiert, bis es klar geworden war. Dann wurde es aus den Zentrifugiergläsern abpipettiert und durch den seitlichen Tubus in die Durchlüftungskolben eingefüllt.

Zur Inaktivierung wurden die Kolben im Wasserbad auf 55° vorgewärmt, kamen dann 2 Stunden in einen Schrank, der auf 58° einstand, wurden am nächsten Tage wieder im Wasserbad vorgewärmt und nochmals eine ½ Stunde im Thermostaten auf 58° erhitzt.

Zuckergehalt des Serums. Da der Zuckergehalt des Serums schwankt, so habe ich, um sicher die notwendige Zuckermenge in meinen Kolben zu haben, stets pro Liter Serum 2 g Glucose in Form der sterilisierten Glucoselösung zugesetzt, und zwar immer erst nach dem Inaktivieren des Serums. Der Zuckergehalt des Serums war demnach in meinen Versuchen höher als der physiologische Zuckergehalt, und dürfte zwischen 3 und 4 Prom. geschwankt haben.

Bicarbonatgehalt des Serums. Auch der Bicarbonatgehalt des Serums ist nicht konstant. Ich habe ihn jedesmal nach dem Inaktivieren

[1]) *Classen*, Theorie und Praxis der Maßanalyse. S. 655. Leipzig 1912.
[2]) Die Vorschrift verdanke ich Herrn *Leopold*, Kaiser Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie, Berlin-Dahlem.

bestimmt, indem ich in Gläser von der Form der Abb. 2 1 ccm Serum einfüllte, in den Anhang 0,2 ccm 4proz. Citronensäure gab, mit 5 Proz. Kohlensäure in Stickstoff sättigte und dann die Citronensäure in das Serum einkippte. Aus der Druckzunahme, die an dem angeschlossenen Barcroftmanometer auftrat, berechnete ich den Bicarbonatgehalt des Serums.

Das Serum enthielt im allgemeinen nicht mehr als $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ Mole Bicarbonat pro Liter, oft aber weniger. Im letzteren Falle habe ich so viel von der sterilen Bicarbonatlösung zu dem inaktivierten Serum zugefügt, daß der Bicarbonatgehalt $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ Mole pro Liter wurde.

Abb. 2.

IV. Messung des Stoffwechsels.

Zur Messung der Atmung bediente ich mich der in Abb. 3 abgebildeten Tröge[1]), zur Messung der Glykolyse der in Abb. 4 abgebildeten Tröge[2]). Näheres findet man in den zitierten Arbeiten.

Ich erinnere noch an die Bedeutung der Quotienten[2]), durch die ich das Ergebnis meiner Messungen ausdrücke. Es bedeutet:

$$Q_{O_2} = \frac{\text{cmm verbrauchten Sauerstoffs}}{\text{mg Gewebe} \times \text{Stunden}} \quad \text{(Atmung)}$$

$$Q_{CO_2}^{N_2} = \frac{\text{cmm Extrakohlensäure, gebildet in Stickstoff}}{\text{mg Gewebe} \times \text{Stunden}} \quad \text{(Glykolyse unter anaeroben Bedingungen)}$$

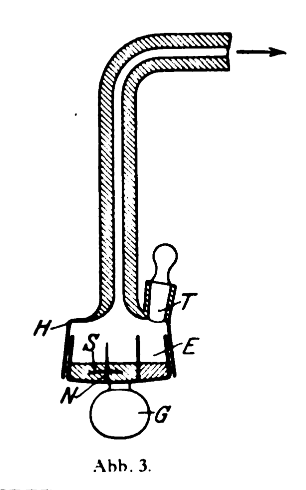


Abb. 3.

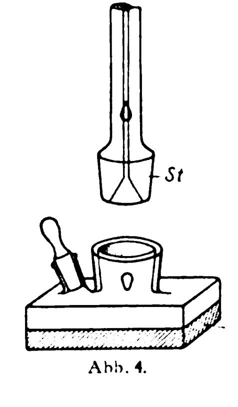


Abb. 4.

[1]) Diese Zeitschr. **142**, 317, 1923.
[2]) Ebendaselbst **152**, 51, 1924.

V. Vorbereitung der Versuche.

Je 250 ccm Ringerlösung oder Serum wurden unter Durchleitung von 5 Proz. Kohlensäure in Stickstoff oder 5 Proz. Kohlensäure in Sauerstoff 24 Stunden lang im Brutschrank in den Durchlüftungskolben gehalten, zur vorläufigen Prüfung, ob die Flüssigkeiten steril waren. Blieben die Flüssigkeiten klar, so wurden die Schnitte in sie eingebracht. Inaktiviertes Pferdeserum trübte sich niemals, während es vorkam, daß sich in der zuckerhaltigen Ringerlösung Bakterien entwickelten.

Zur Gewinnung steriler Tumorschnitte verfuhr ich folgendermaßen: Das Tier wurde durch Nackenschlag getötet, mit alkoholfeuchter Watte abgerieben und dann 5 Minuten in 0,5proz. Sublimatlösung untergetaucht. Nach Trocknung des Tieres mit sterilem Filtrierpapier wurde der Tumor herauspräpariert. Die Schnitte wurden mit Rasiermessern, die trocken sterilisiert waren, angefertigt, in einem besonders gereinigten und für meine Zwecke reservierten Operationsraum.

Es versteht sich, daß nur geschlossene Tumoren als Versuchsmaterial in Betracht kamen. Bauchtumoren von Tieren, die Exsudat in der Bauchhöhle hatten, wurden nicht verwendet. Die Prüfung auf Sterilität nach Abschnitt II zeigte in keinem Falle Anwesenheit von Bakterien an, wenn ich mit Sarkom arbeitete, aber mehrmals, wenn ich mit Carcinom arbeitete.

VI. Ergebnisse mit dem Flexner-Joblingschen Rattencarcinom.

Die Ergebnisse einiger Transplantationsversuche teile ich in Tabelle I mit. In der ersten Spalte steht die Nummer des Versuchs. In der zweiten Spalte ist die Flüssigkeit angegeben, in der die Schnitte im Brutschrank gehalten wurden, in der dritten Spalte das Gasgemisch.

Tabelle I.
*Flexner-Jobling*sches Rattencarcinom (Transplantation).

Nr.	Flüssigkeit	Gasgemisch	Zeit Std.	Ergebnis der Transplantation: Zahl der geimpften Tiere	Es starben in d. Beobachtungszeit aus unbekannt. Gründen	Zahl der angegangenen Tumoren	Zahl d. angegangenen Tumoren in Proz. d. überlebenden Tiere
1	Ringer *ohne* Glucose	5 Proz. CO_2-N_2	24	10	—	0	—
2	„ „ „	5 „ CO_2-N_2	24	5	2	0	—
3	„ *mit* „	5 „ CO_2-N_2	24	12	1	4	36
4	„ „ „	5 „ CO_2-N_2	24	6	2	4	100
5	„ „ „ n/1000 Blausäure	5 „ CO_2-N_2	24	20	—	8	40
6	dasselbe	5 „ CO_2-N_2	24	10	—	8	80
7	Ringer *mit* Glucose	5 „ CO_2-O_2	72	5	—	5	100

mit dem die Kolben während der Versuche durchlüftet wurden. In der vierten Spalte steht die Zeit, während der die Schnitte im Brutschrank gehalten wurden, das ist die Zeit zwischen der Herstellung der Schnitte und der Transplantation. Die vierte Spalte enthält das Ergebnis der Transplantation. Leider bestanden zeitweise Seuchen unter den Versuchsratten, so daß nicht immer alle Tiere, die geimpft waren, eine genügend lange Zeit, nämlich 4 Wochen lang, beobachtet werden konnten.

Betrachten wir die Tabelle I, so zeigt sich (Versuche 1 und 2), daß Tumorzellen, die in zucker*freier* Ringerlösung anaerob gehalten werden, nach 24 Stunden nicht mehr leben, daß dagegen der Sauerstoffmangel 24 Stunden vertragen wird, wenn (Versuche 3 bis 6) die Ringerlösung Zucker enthält. Besonders beweisend in dieser Hinsicht sind die Versuche 5 und 6, in denen die Ringerlösung $^1/_{1000}$ Mol Blausäure pro Liter enthielt, eine Blausäurekonzentration, die die Atmung der Tumorzelle[1]) vollständig hemmt. Im ganzen folgt aus den Versuchen 1 bis 6, daß das *Flexner-Jobling*sche Rattencarcinom ohne Sauerstoff, auf Kosten der Zuckerspaltung, leben kann.

Allerdings bleibt dieser Tumor unter *aeroben* Bedingungen in zuckerhaltiger Ringerlösung länger am Leben als unter anaeroben Bedingungen. Schnitte, die unter anaeroben Bedingungen länger als 24 Stunden in zuckerhaltiger Ringerlösung gehalten waren, lieferten —

Tabelle II.

*Flexner-Jobling*sches Rattencarcinom (Stoffwechsel).

Nr.	Flüssigkeit	Gasgemisch	Glykolyse, gemessen in Ringerlösung, 0,2 Proz. Glucose in 5 Proz. CO_2-N_2 nach			
			0 Std. $Q_{CO_2}^{N_2}$	24 Std. $Q_{CO_2}^{N_2}$	48 Std. $Q_{CO_2}^{N_2}$	72 Std. $Q_{CO_2}^{N_2}$
1	Ringerlsg. *ohne* Glucose	5 Proz. CO_2-N_2	+ 28	0		
2	dasselbe	5 „ CO_2-O_2	+ 34			+ 13
3	Ringerlsg. *mit* Glucose	5 „ CO_2-N_2	+ 31			+ 8
4	dasselbe	dasselbe	+ 34			+ 5
5	dasselbe n/1000 HCN	dasselbe	+ 28	+ 16		
6	Kaninchenserum, inaktiviert	dasselbe	+ 25	+ 19		
7	dasselbe	dasselbe	+ 21	+ 16	+ 17	+ 15
8	dasselbe	dasselbe	+ 20		+ 15	+ 6
9	dasselbe	dasselbe	+ 38	+ 18		
10	dasselbe	5 Proz. CO_2-O_2	+ 21	+ 23	+ 23	
11	Rattenserum	5 „ CO_2-N_2	+ 22	+ 18		
12	dasselbe	dasselbe	+ 28	+ 19	+ 17	
13	dasselbe	dasselbe	+ 28	+ 22		
14	dasselbe	5 Proz. CO_2-O_2	+ 28	+ 32		

[1]) Diese Zeitschr. **152**, 309, 1924.

mit *einer* Ausnahme — keine Tumoren, während sie bei Sättigung der Ringerlösung mit Sauerstoff (Versuch 7) nach 3 Tagen immer angingen.

Das Gesagte wird gestützt durch das Ergebnis von Stoffwechselmessungen, die ich in Tabelle II zusammengestellt habe. Unter anaeroben Bedingungen ist die Glykolyse verschwunden, wenn die Schnitte (Versuch 1) 24 Stunden in zuckerfreier Ringerlösung gewesen sind, während bei Gegenwart von Zucker (Versuche 3, 4 und 5) die Glykolyse länger erhalten bleibt. Unter aeroben Bedingungen findet man selbst nach dreitägigem Aufenthalt in zucker*freier* Ringerlösung noch eine beträchtliche Glykolyse.

Unter allen Umständen — ob bei Gegenwart oder bei Abwesenheit von Zucker — erhalten die aeroben Bedingungen den Stoffwechsel länger als die anaeroben Bedingungen. Denn in Stickstoff fällt die Glykolyse im Laufe von Tagen immer ab, während sie in Sauerstoff (Versuche 10 und 14) relativ lange unverändert bleibt oder sogar vielleicht etwas ansteigt.

VII. Ergebnisse mit dem Jensenschen Rattensarkom.

Die Ergebnisse meiner Versuche mit dem *Jensen*schen Rattensarkom teile ich in den Tabellen III und IV mit, die in der gleichen Weise angeordnet sind, wie die Tabellen I und II.

Tabelle III.

*Jensen*sches Rattensarkom (Transplantation).

Nr.	Flüssigkeit	Gasgemisch	Zeit Std.	Ergebnis der Transplantation: Zahl der geimpften Tiere	Es starben in d. Beobachtungszeit aus unbekannt. Gründen	Zahl der angegangenen Tumoren	Prozentische Impfausbeute
1	Pferdeserum, inaktiviert	5 Proz. CO_2-N_2	24	10	—	8	80
2			24	6	—	2	33
3			48	7	—	7	100
4			48	6	—	6	100
5			72	10	—	8	80
6			72	9	—	7	78
7			120	10	—	3	30

Die Transplantationsversuche sind in Tabelle III zusammengestellt, das Ergebnis ist eindeutig. Die Sarkomzelle kann unter anaeroben Bedingungen in Serum leben, und zwar mindestens 5 Tage. Bis zu 3 Tagen sind die Impfausbeuten so, wie bei frisch geimpftem Material, abgesehen von Versuch 2, in dem die Impfausbeute niedriger ist.

Tabelle IV.
*Jensen*sches Rattensarkom (Stoffwechsel).

Nr.	Flüssigkeit	Gasgemisch	Stoffwechsel, gemessen in Ringerlösung, 0,2 Proz. Zucker nach Stunden									
			0		24		48		72		120	
			Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{N_2}$	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{N_2}$	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{N_2}$	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{N_2}$	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{N_2}$
1	Pferdeserum, inaktiviert	5 Proz. CO_2–N_2	— 14	+ 38	— 3	+ 38						
2			— 9	+ 42	— 1	+ 26						
3			— 13	+ 35			— 2	+ 22	— 1	+ 25		
4			— 6	+ 30			— 2	+ 20	— 2	+ 21	— 1	+ 17
5			— 6	+ 29							— 0,5	+ 24
6			— 7	+ 35					— 2	+ 20		
7		5 Proz. CO_2–O_2	— 13	+ 35			— 2	+ 21	0	+ 15		
8			— 6	+ 30					— 5	+ 15	— 2	+ 15
9			— 7	+ 35					— 2	+ 19		

Die Stoffwechselversuche sind in Tabelle IV zusammengestellt. Für diesen Tumor habe ich neben der Glykolyse auch die Atmung gemessen. Die Versuche 1 bis 6 sind unter anaeroben, die Versuche 7 bis 9 unter aeroben Bedingungen angestellt. Die Atmung fällt im allgemeinen beim Aufenthalt der Schnitte in den Durchlüftungskolben schnell ab, die Glykolyse dagegen nur langsam, und zwar unter anaeroben Bedingungen nicht schneller, sondern eher langsamer als unter aeroben Bedingungen. Im Gegensatz zum *Flexner*-Tumor leidet der *Jensen*-Tumor durch Sauerstoffmangel nicht.

Derselbe Schluß ergibt sich, wenn man Präparate des *Jensen*-Tumors unter dem Mikroskop betrachtet. Das unter anaeroben Bedingungen gehaltene Gewebe ist nicht *mehr*, sondern eher weniger geschädigt, als das unter aeroben Bedingungen gehaltene. Die Abb. 5, 6 und 7 sind Photogramme des *Jensen*schen Sarkoms. Nr. 5 ist das Bild frisch entnommenen Tumorgewebes[1]), Nr. 6 das Bild nach dreitägiger *Aerobiose* im Brutschrank (in inaktiviertem Pferdeserum und 5 Proz. $CO_2 - O_2$), Nr. 7 das Bild nach dreitägiger *Anaerobiose* im Brutschrank (in inaktiviertem Pferdeserum und 5 Proz. $CO_2 - N_2$).

Macht man ähnliche Versuche mit Lebergewebe, so findet man, wie nicht anders zu erwarten, daß Sauerstoffmangel das Gewebe schnell schädigt, Nr. 8 ist ein Photogramm frischen Lebergewebes, Nr. 9 nach zweitägiger *Aerobiose* im Brutschrank (in inaktiviertem Pferdeserum, in 5 Proz. $CO_2 - O_2$), Nr. 10 nach zweitägiger *Anaerobiose* im Brutschrank (in inaktiviertem Pferdeserum in 5 Proz. $CO_2 - N_2$).

[1]) Die Gewebe wurden in Formol fixiert und mit Hämotoxylinerythrosin gefärbt.

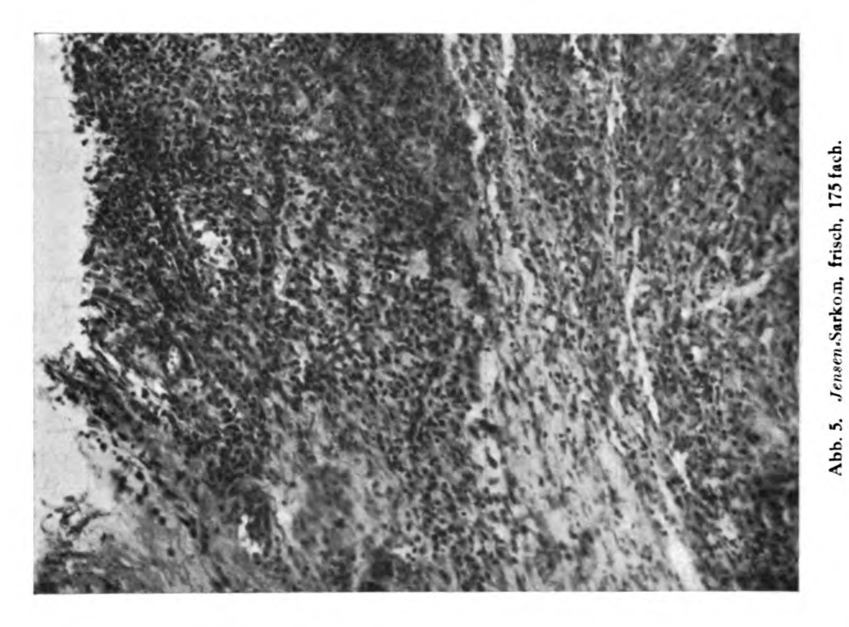


Abb. 5. *Jensen*-Sarkom, frisch, 175 fach.

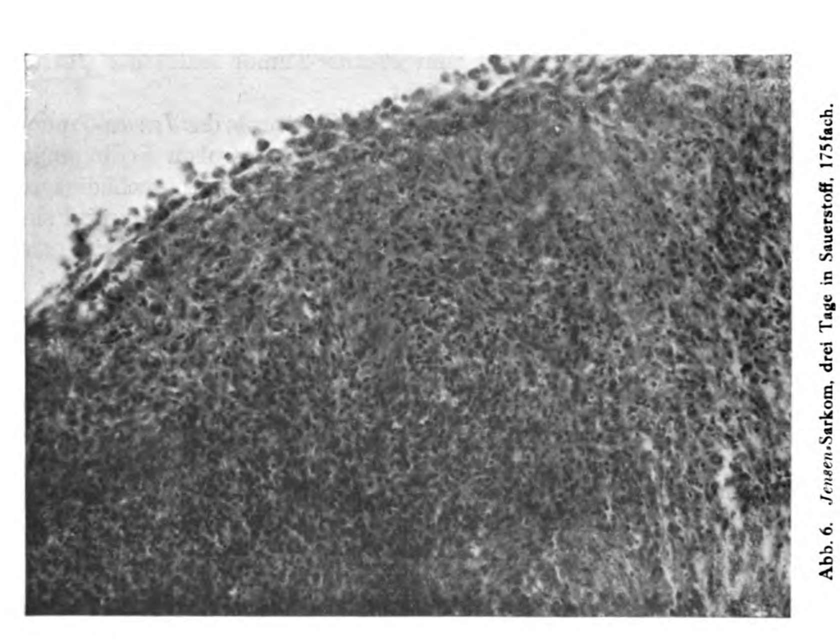


Abb. 6. *Jensen*-Sarkom, drei Tage in Sauerstoff, 175 fach.

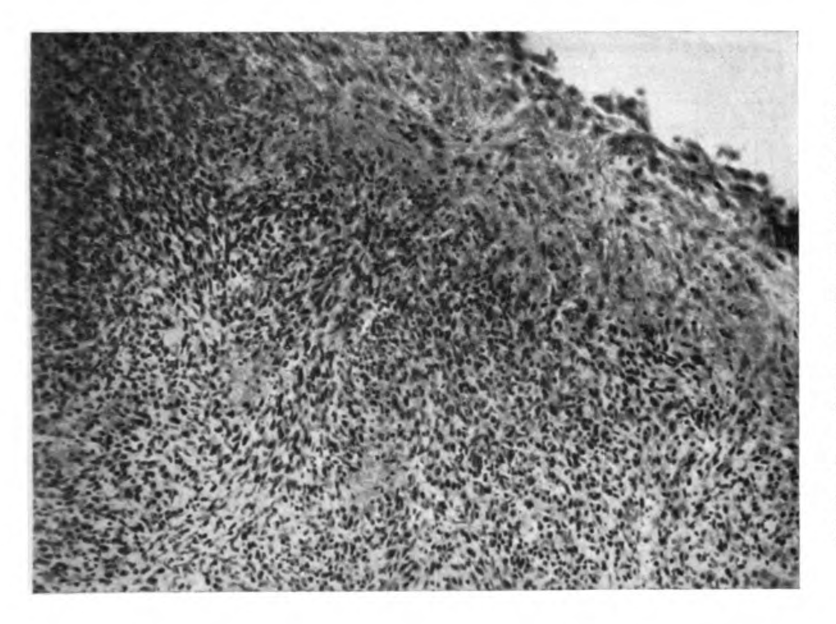


Abb. 7. *Jensen*-Sarkom, drei Tage in Stickstoff, 175 fach.

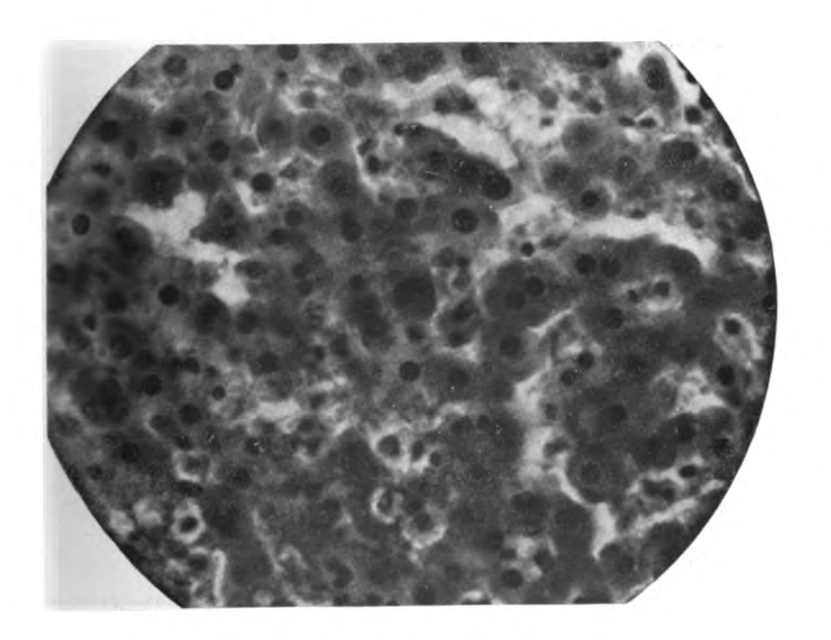


Abb. 8. Rattenleber, frisch. 600fach.

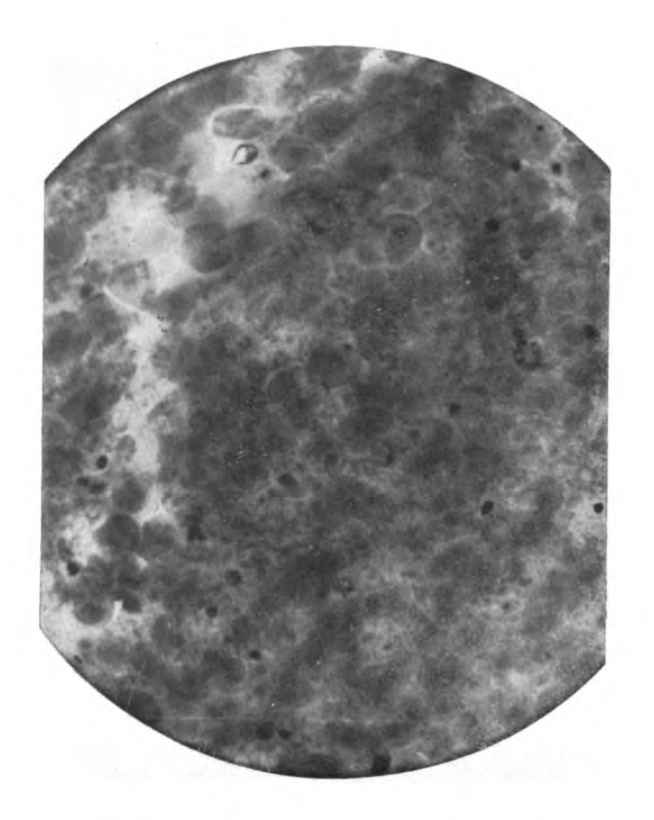


Abb. 10. Rattenleber, zwei Tage in Stickstoff, 600fach.

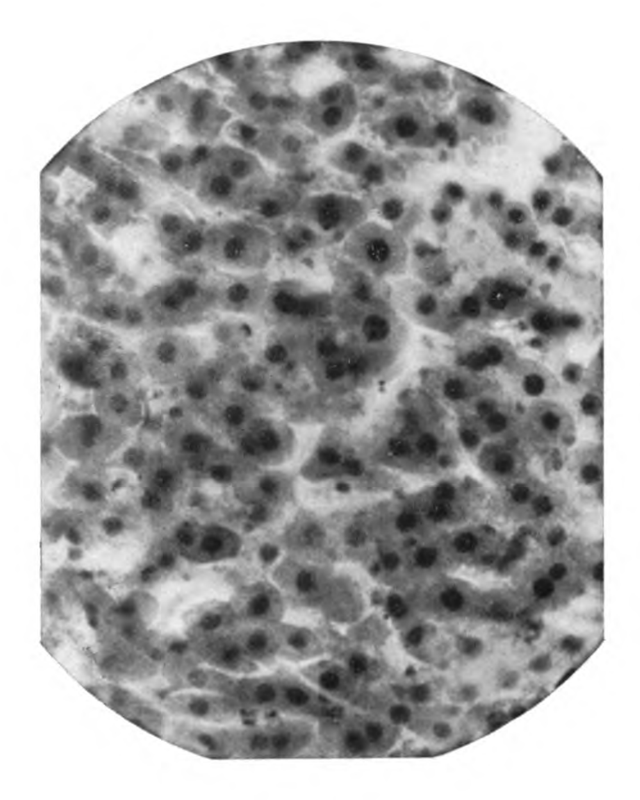


Abb. 9. Rattenleber, zwei Tage in Sauerstoff, 600fach.

VIII. Ergebnis mit dem Rousschen Hühnersarkom.

Mit dem *Rous*schen Hühnersarkom habe ich nur *einen* Transplantationsversuch ausgeführt, dessen Ergebnis eindeutig war. Die Flüssigkeit, in der die Schnitte in den Durchlüftungskolben gehalten wurden, war inaktiviertes Pferdeserum, die Bedingungen waren anaerobe (5 Proz. $CO_2 - N_2$). Nach 3 Tagen wurde transplantiert, von fünf geimpften Hühnern zeigten innerhalb von 20 Tagen vier Tiere Sarkome. Dies beweist, daß auch das *Rous*-Sarkom ohne Sauerstoff leben kann.

IX. Zusammenfassung.

Die drei geprüften Tumoren, das *Flexner-Jobling*sche Rattencarcinom, das *Jensen*sche Rattensarkom und das *Rous*sche Hühnersarkom, können unter anaeroben Bedingungen leben. Die Frage, ob die Tumoren unter anaeroben Bedingungen auch *wachsen*[1]) können, ist durch meine Arbeit nicht entschieden.

---

[1]) Mit der Frage, ob Zellen höherer Tiere und Tumorzellen ohne Sauerstoff wachsen können, hat sich *Montrose T. Burrows* beschäftigt (Amer. Journ. Physiol. **48**, 13, 1917; Proc. Amer. Physiol. Society, 66. Annual Meeting, Dezember 1923), so viel ich sehen kann, ohne die Frage zu entscheiden.

Über den Gehalt an einigen Stoffen beim Igel im Winterschlaf.

Von

Ernst Weinland.

(Aus dem physiologischen Institut in Erlangen.)

(Eingegangen am 10. März 1925.)

Wir sind gewohnt, beim Säugetier und Menschen eine annähernd fortgesetzte, fast kann man sagen tägliche Ergänzung des Stoffbestands des lebenden Körpers anzunehmen. Sobald diese Stoffzufuhr längere Zeit, d. h. z. B. schon mehr als einen Tag, beim Menschen ausbleibt, sprechen wir bei dem Betreffenden nicht mehr von Nüchternheit, sondern von einem Hungerzustand, eine Bezeichnung, deren Berechtigung durch das auftretende Hungergefühl sich beweist. Während wir hier also den Fall haben, daß ein Mangel an bestimmten Stoffen sich anzeigt, kennen wir bei gewissen Säugetieren, den Winterschläfern bzw. den heterothermen Tieren (von anderen Tierformen sehe ich hier ab) die Tatsache, daß die Nahrungszufuhr wochen-, ja monatelang vollständig aussetzt, ohne daß bei dem Tiere ein Hungergefühl sich einstellt, ohne daß es demzufolge Nahrung sucht oder aufnimmt. Es muß demnach bei diesen Tieren ein *völlig* ausreichender Vorrat an Materialien zur Unterhaltung des Lebensprozesses aufgespeichert sein, mit Einschluß auch z. B. der sogenannten Vitamine. Ich habe es für dankbar gegehalten, zu dieser Frage, die bis jetzt noch wenig bearbeitet ist, einige Angaben festzustellen, um eine erste Orientierung über die hier in erster Linie in Betracht kommenden Stoffe zu erlangen. Deshalb habe ich bei einigen Igeln, die ich hier erhalten habe, in verschiedenen Zeitpunkten während des Winterschlafs eine Bestimmung des Gehalts an Fett (Fettsäure), Glykogen, Stickstoff und Wasser im Körper ausgeführt. Es wurde dabei jeweils der gesamte Körper des Tieres nach Herausnahme der Leber mehrmals durch die Fleischmaschine geschickt und möglichst gleichmäßig gemischt. Darauf wurden abgewogene Teile des Körpergemisches für die verschiedenen Bestimmungen verwendet. Die Leber wurde für sich auf ihren Gehalt an Glykogen verarbeitet. Im folgenden teile ich die Ergebnisse dieser Bestimmung mit

Ich berichte zunächst über die Art und Weise, wie die Tiere gehalten wurden.

Die Tiere, welche im Sommer erhalten wurden, wurden in einem Zwinger im Freien gefüttert mit Milch, Brot, auch gelegentlich mit Fröschen, im Herbst erhielten sie öfter Pferdefleisch. Zu Anfang November erhielten sie zusammen im Tag 2 Liter Milch, dazu 3 bis 4 Pfund Brot, die aber in der zweiten Hälfte des Monats nicht mehr ganz verzehrt wurden. In der Mitte des Monats war die Temperatur oft recht niedrig (unter Null Grad), es wurde zunehmend weniger Nahrung genommen, daher erhielten die Tiere vom 15. November ab nur noch 1 Liter Milch im Tag, vom 22. November ab nur noch ½ Liter täglich. Die Tiere haben sich um diese Zeit in einer Kiste eine Art Nest aus Laub, Holzwolle und anderem gebaut, in dem sie sich halten. Man sieht in dem zweiten Drittel des Novembers gewöhnlich abends nur noch einen Igel. Am 1. Dezember gegen Abend wurden die beiden Zugänge zu dem Laublager der Tiere mit je einem Pfropf von Holzwolle leicht verlegt, am 2. Dezember zeigt sich keine Veränderung an den Eingängen, die Tiere haben also das Nest nicht mehr verlassen; am 2. Dezember wird Tier Nr. 1 aus dem Nest entnommen, die anderen Tiere bleiben in ihrem selbstgefertigten Nest im Freien in ihrem Zwinger.

In der ersten Dezemberhälfte ist noch abends mehrmals ein Igel außerhalb der Kiste bzw. Laubes gesehen worden, in den ersten Tagen nach der Herausnahme des Igels Nr. 1 auch gelegentlich zwei Tiere; zuletzt wurde ein Tier um die Mitte des Dezembers abends im Zwinger herumlaufend gesehen, seitdem wurde kein Tier mehr gesehen. Am 8. Januar 1915 wurde Igel 2 entnommen, am 1. Februar 1915 Igel 3.

Im März wurden Milch und Brot nicht berührt, der April war meist noch kalt; Milch und Brot wurden Anfang Mai noch nicht berührt, am 14. Mai wurde das letzte Tier zum erstenmal wieder gehört, hin und her gehend im Zwinger. Am 15. Mai wurde Igel 4 entnommen.

Ich berichte nunmehr über das Ergebnis der einzelnen Bestimmungen.

2. Dezember 1914. 11½ Uhr.

Igel Nr. 1. ♂.

Gewicht . . . . 1047,3 g total
Lebergewicht (ohne Galle) . . . 23,9 g = 2,3 Proz. des frischen Gewichts
Tierkörper ohne Leber. . . . . 1023,4 g

Temperatur des Tieres sinkt beim Einlegen des Thermometers in die Kugel, die das Tier bildet, in 2 Minuten von 10° auf unter 8°, bald auf 7° C (nach dem Töten).

Der Magen des Tieres war leer, ebenso der Darm (Reaktion alkalisch, Lackmuspapier).

Unter der Haut viel Fett abgelagert. Das gesamte Tier, mit Ausnahme der Leber, wird dreimal durch die Fleischmaschine geschickt.

Trockensubstanz.

a) 22,01 g Körpergemisch,

im Wägegläschen 7 Tage im Trockenschrank (von der Temperatur des siedenden Wassers) gehalten; im Trockenschrank tritt starker Fettdampfgeruch auf. Öl am Boden des Wägegläschens schließlich nicht mehr sichtbar.

Es ergaben sich 12,945 g Trockensubstanz = 58,81 Proz.

Das Produkt wird mit absolutem Alkohol und Äther ausgezogen, darauf nochmals in den Trockenschrank gebracht. Es werden erhalten:

5,7284 g Trockensubstanz, in der Hauptsache fettfrei
= 44,24 Proz. der Gesamt-Trockensubstanz
= 26,02 Proz. der frischen Substanz,
daneben 7,1866 g absoluten Alkohol-Ätherextrakts
= 55,50 Proz. der Gesamt-Trockensubstanz
= 32,65 Proz. der frischen Substanz,
zusammen 99,74 Proz. der Gesamt-Trockensubstanz
zusammen 58,67 Proz. der frischen Substanz.

b) 11,67 g Körpergemisch,

im Wägegläschen 7 Tage im Trockenschrank wie oben!

Es ergaben sich 6,7624 g Trockensubstanz = 57,95 Proz.

Das Produkt wird mit absolutem Alkohol und Äther ausgezogen, darauf nochmals in den Trockenschrank gebracht.

Es wurden gefunden:

3,0935 g Trockensubstanz, in der Hauptsache fettfrei
= 45,76 Proz. der Gesamt-Trockensubstanz
= 26,51 „ der frischen Substanz,
daneben 3,6498 g absoluten Alkohol-Ätherextrakts
= 53,99 Proz. der gesamten Trockensubstanz
= 31,27 „ der frischen Substanz,
es werden wiedergefunden von der
frischen Substanz . . . . 57,78 Proz.
gesamten Trockensubstanz . . . . 99,75 „

Andere Berechnung:

Mittelw. d. ges. Trockensubst. von Wert a) u. b) 58,38 Proz. d. fr. Subst.
„ d. Ätherextrakts des frischen Tiergewichts 34,02 „ (s. unten!)
somit berechneter Wert an fettfreier Trockensubstanz 24,36 „

Glykogen.

Es wurden 503,5 g Brei des Tierkörpers ohne Leber in 500 ccm 58 proz. heiße KOH auf dem siedenden Wasserbad gebracht. Nach Kochdauer von 2 Stunden und 10 Minuten ist das Gewebe gelöst[1]).

Der Kolbeninhalt wird mit 1000 ccm Wasser in ein großes Becherglas gebracht; davon werden:

a) 970 ccm mit 120 ccm Fett = 850 ccm Tierlösung im Becherglas mit 1500 ccm 96 proz. Alkohols ausgefällt.

[1]) In dem Kolben steht eine Fettschicht von 17 mm Höhe über der Lösung, bei einem Umfang des Kolbens an dieser Stelle von 42 cm entspricht das einer Fettmenge von ungefähr 238 ccm.

b) Der Rest der Tierlösung (nach Abrechnung des Fettes nicht ganz 850 ccm) wird im Becherglas mit 2 Volumina 96proz. Alkohols gefällt.

a) und b) nach Wiederlösung in heißem Wasser nach dem Erkalten mit Quecksilberjodid-Jodkalium in Tropäolin-saurer Lösung ausgefällt: Eiweißreste entfernt. Filtrat wird gefällt mit 2 Volumina 96proz. Alkohol; der Niederschlag wird gewaschen mit Alkohol 96proz., Alkohol 100 Proz., Äther, Alkohol 100 Proz. und bei der Temperatur des siedenden Wassers 6 Stunden getrocknet.

Es fanden sich:

in a)	0,3352 g	Glykogen
in b)	0,3251 g	„
zusammen in 503,4 g	0,6603 g	Glykogen, somit
im Körper ohne Leber (in 1023,4 g) . . .	1,3424 g	„

Leberglykogen.

Leber (ohne Gallenblase), 23,9 g, nach 2 Stunden in 37 ccm siedender 58proz. Lauge gelöst. Lösung mit Wasser in ein Becherglas gespült und mit 1½ Volumina 96proz. Alkohol versetzt; der Niederschlag wird in Wasser gelöst, mit Salzsäure und Quecksilberjodid-Jodkalium die Eiweißreste ausgefällt; die Lösung wird abfiltriert und mit 2 Volumina Alkohol gefällt.

Nach dem Trocknen ergaben sich . .	0,3870 g	Glykogen
im übrigen Tier	1,3424 g	„
im ganzen Tier	1,729 g	Glykogen

Fett.

26,40 g Körpergemisch wurden verseift mit 58proz. KOH, die Lösung wird in dem Scheidetrichter mit starker HCl angesäuert; nach dem Abkühlen mit Äther (unter zweimaligem Nachwaschen) aufgenommen; die Lösung durch Asbestfilter filtriert, getrocknet. Es ergaben sich:

8,9835 g	Ätherextrakt	in	26,40 g	Körpergewicht	(ohne Leber)
34,02 g	„	„	100 g	„	(„ „)
348,1 g	„	„	1023,4 g	„	(„ „)

Stickstoff.

a) 19,74 g Körpergemisch wurden mit H_2SO_4 und einem Tropfen Quecksilber verbrannt, in Meßkolben zu 500,745 ccm gebracht.

99,53 ccm enthalten . . . . 131,7 mg N
(Mittel von vier Bestimmungen)
500,745 ccm enthalten . . . . 0,6627 g N

davon enthalten
100 g Körpergemisch (ohne Leber) . . 3,357 g N

b) 19,34 g Körpergemisch wurden mit H_2SO_4 und einem Tropfen Quecksilber verbrannt, aufgefüllt zu 499,958 ccm.

99,53 ccm enthalten . . . . 105,2 mg N
499,96 „ „ . . . . 528,3 „ N

demnach sind in 100 g Körpergemisch enthalten 2,732 g N.

Mittelwert für 100 g Körpergewicht (ohne Leber) 3,044 g N,
in 1023,4 g Körpergewicht (ohne Leber) somit . . 31,16 g N.

8. Januar 1915.

Igel Nr. 2. ♂.

Im Kalten, bei offenem Fenster gearbeitet. Tiergewicht 1061,9 g, Temperatur im Tier 8° C. Leber 23,8 g (ohne Gallenblase) = 2,2 Proz. des frischen Tieres. Darm und Magen leer, Reaktion in beiden gegen Lackmus alkalisch. Harnblase: etwa 2 ccm saurer Harn. Herz acht Schläge in 30 Sekunden. Milz groß, blaurot. Den gesamten Körper ohne Leber dreimal durch die Fleischmaschine geschickt. Brei möglichst gut gemischt, hat schließlich eine Temperatur von 14° C.

Trockensubstanz.

a) In Wägegläschen 28,43 g Tiergemisch (ohne Leber)
liefern 14,469 g Trockensubstanz,
= 50,89 Proz. der frischen Substanz,
davon sind im Alkohol-Ätherextrakt 7,475 g
= 26,29 Proz. der frischen Substanz
= 51,66 „ der trockenen Substanz,
es bleiben als annähernd fettfreier Rückstand 6,983 g
Alkohol-Ätherextrakt + Rückstand zusammen 14,458 g Trockensubstanz
= 50,85 Proz. der frischen Substanz.
Annähernd fettfreier Rückstand
= 24,56 Proz. der frischen Substanz
= 48,27 „ der trockenen Substanz.

b) In Wägegläschen 24,34 g Tiergemisch (ohne Leber)
ergeben 12,245 g Trockensubstanz
= 50,31 Proz.,
davon sind im Alkohol-Ätherextrakt 6,325 g
= 26,00 Proz. der frischen Substanz
= 51,66 „ der Trockensubstanz,
bleiben als annähernd fettfreier Rückstand 5,913 g
= 24,29 Proz. der frischen Substanz
= 48,29 „ der Trockensubstanz
zusammen 12,238 g Trockensubstanz
= 50,28 Proz.

Andere Berechnung:

Mittelw. d. ges. Trockensubst. von Wert a) u. b) 50,60 Proz. d. fr. Tiergemischs,
„ d. Ätherextrakts im fr. Tiergemisch 28,65 „ (s. u. Fettbest.!),
somit im frischen Tiergemisch (ohne Leber)
fettfreie Trockensubstanz . . . . 21,95 Proz.

Glykogen.

Leber dunkelbraun, rotgelb. Gewicht (ohne Galle) 23,8 g. In 30 ccm siedender 60proz. KOH (Wasserbad) in 2 Stunden gelöst, mit Wasser in Becherglas gespült, mit 2 Volumina 96proz. Alkohol gefällt; nochmals gelöst, Quecksilberjodid-Jodkaliumfällung in (Tropäolin 00) salzsaurer Lösung, 0,198 g Glykogen.

Gesamtkörper ohne Leber,

1038,1 g.

Zur Glykogenbestimmung: 504,4 g (gut gemischt) in 500 ccm 60proz. KOH siedend gelöst, mit 2 Volumina 96proz. Alkohol gefällt,

abfiltriert. Niederschlag gelöst, mit HgJ_2JK-HCl gefällt, Filtrat + 2 Volumina 96proz. Alkohol: Niederschlag. Gefunden 0,472 g Glykogen

in 1038,1 g . . . 0,972 g Glykogen
+ 0,198 g „ (Leber)
Gesamtglykogen 1,170 g Glykogen

Fett.

42,44 g Körpergemisch (ohne Leber) heiß gelöst in 60proz. KOH, in Scheidetrichter gebracht, mit 38proz. HCl (Spur Verlust?) angesäuert; es werden erhalten:

12,157 g gereinigter Ätherextrakt in 42,44 g Tiergemisch (ohne Leber) (gelb, flüssig)
28,645 g gereinigter Ätherextrakt in 100 g Tiergemisch (ohne Leber)
297,36 g „ „ 1038,1 g „ („ „).

Stickstoff.

a) 30,98 g Körpergemisch (ohne Leber) verbrannt, in Meßkolben zu 500,745 ccm aufgefüllt:

in 99,533 ccm . . . . 192,9 mg N
„ 500,745 „ . . . . 967,9 „ N
(= 30,98 g Körper)
„ 100 g Körper . . . . 2,999 g N

b) 23,92 g Körpergemisch (ohne Leber) verbrannt, in Meßkolben zu 499,958 ccm aufgefüllt:

in 99,533 ccm . . . . 151,7 mg N
„ 499,96 „ . . . . 762,3 „ N
(= 23,92 g Körpergemisch)
„ 100 g Körpergemisch . . . . 3,186 g N

in 100 g Körpergemisch (ohne Leber) Mittelwert . . . **3,093** g N
in 1038,1 g Körpergemisch (ohne Leber) Mittelwert . . 32,10 g N.

1. Februar 1915.

Igel Nr. 3,

423,6 g. Temperatur im geöffneten Tier herabgehend zu 2,0° C. Magen leer (gegen Lackmus kräftig alkalisch). Darm leer, ebenfalls alkalisch. Hat lebende Flöhe (wie die früheren Tiere). Herz schlägt sehr langsam, wenig Fett sichtbar.

Es ist möglich, daß das Tier die noch bevorstehende lange Zeit ohne Nahrungszufuhr nicht überstanden hätte. Vergleiche hierzu die Zusammenstellung der Befunde am Ende der Abhandlung!

Trockenbestimmung.

a) in 32,60 g Körpergemisch . . . . 14,448 g Trockensubstanz
„ 100,00 g „ . . . . 44,32 g „
Fett hier nicht gesondert bestimmt.

b) 24,17 g Körpergemisch liefern . . 10,700 g Trockensubstanz
100,00 g „ „ . . 44,27 g „

Mittelw. für 100 g Körpergemisch (ohne Leber) 44,29 g Trockensubstanz,
n.d.Fettbest.in 100g Körpergemisch (ohne Leber) 15,57 g Ätherextrakt,
somit in 100 g Körpergemisch etwa . . . . . 28,72 g fettfr.Trockensubst.

Glykogen.

Leber 15,2 g = 3,6 Proz. des frischen Tieres 2 Stunden mit 60proz. KOH auf dem siedenden Wasserbad; gelöst mit Wasser in Becherglas + 2 Volumina Alkohol; Niederschlag mit Wasser gelöst, Fällung mit HgJ_2JK-HCl. Filtrat + 2 Volumina Alkohol; Niederschlag 0,181 g Glykogen.

Gesamtkörper ohne Leber.

	423,6 g
−	15,2 g Leber
	408,4 g

196,94 g Brei mit 60proz. KOH in siedendem Wasserbad bis gelöst; große Fettaugen auf der Lösung, doch keine Fettschicht wie bei Nr. 1 und 2; mit Wasser in Becherglas gebracht + 2 Volumina Alkohol; Niederschlag gelöst mit Wasser, Fällung mit HgJ_2JK-HCl. Filtrat + 2 Volumina Alkohol; Niederschlag

in 196,94 g	0,292 g Glykogen
„ 408,4 g	0,606 g „
in Leber	0,181 g „
Summe des Glykogens im ganzen Tier . . .	0,787 g Glykogen

Fett.

36,97 g Körpergemisch (ohne Leber) gelöst in 60proz. KOH (kochend); hierzu zugesetzt 38proz. HCl, bis zur sauren Reaktion; mit Äther aufgenommen (7 bis 8 Tropfen verloren) und gereinigt;

bei 100° getrocknet	5,757 g Ätherextrakt
in 100 g Körpergemisch	15,57 Proz. „
in 408,4 g Körpergemisch (ohne Leber)	63,59 g „

Große Fettaugen, aber keine Fettschicht über der Körperbreimasse wie in Nr. 1 und 2.

Stickstoff.

a) 21,85 g Körpergemisch (ohne Leber) verbrannt mit konzentrierter Schwefelsäure und einem Tropfen Quecksilber. Lösung zu 500,745 ccm aufgefüllt;

in 99,533 ccm	184,0 mg N
„ 500,745 „	925,5 „ N
(= 21,85 g Körpergemisch)	
in 100 g Körpergemisch (ohne Leber) . .	4,236 g N

b) 28,00 g Körpergemisch (ohne Leber) verbrannt mit konzentrierter Schwefelsäure und einem Tropfen Quecksilber, Lösung auf 500,745 ccm gebracht:

in 99,533 ccm	235,4 mg N
„ 500,745 „	1,184 g N
(= 28,00 g Körpergemisch)	
in 100 g Körpergemisch (ohne Leber) . .	4,230 g N

in 100 g Körpergemisch (ohne Leber) Mittelwert	4,233 g N,
in 408,4 g Körpergemisch (ohne Leber)	17,29 g N.

15. Mai 1917.

Igel Nr. 4, ♂. 580,2 g.

Das Tier wurde gestern zum erstenmal wieder gehört, hin und her gehend; hat in den Tierbehälter gestellte Milch und Brot vor 1 Woche nicht

angerührt, der ganze April fast war noch kalt, im März wurde Milch und Brot auch nicht berührt.

Temperatur in der Leibeshöhle 22,5° C. Herz bewegt, langsam, allmählich etwas schneller. Fett so gut wie nirgends zu sehen, auch nicht unter dem Fell. Gallenblase voll. Harnblase ziemlich voll. Magen leer, gegen Lackmus alkalisch. Darm leer, gegen Lackmus alkalisch. Hoden sehr groß.

Trockensubstanz.

a) 20 g Körpergemisch liefern 7,784 g Trockensubstanz
100 g „ „ 38,918 g „
Fett hierbei nicht gesondert bestimmt.

b) 16,2 g Körpergemisch liefern 6,556 g Trockensubstanz
100 g „ „ 40,273 g „

Mittelwert für 100 g Körpergemisch. . . . . 39,60 Proz. Trockensubstanz
davon ab an Ätherextrakt in 100 g Körpergemisch 4,48 „
somit bleibt an fettfreier Trockensubstanz in
dem Körpergemisch (ohne Leber). . . 35,12 „

Glykogen.

Leber 14,3 g, ziemlich dunkel, rotbraun = 2,5 Proz. des frischen Tieres, 2 Stunden mit 25 ccm KOH auf siedendes Wasserbad gebracht, bis zur Lösung; mit 40 ccm Wasser in Becherglas gespült, mit 2 Volumina Alkohol gefällt, Niederschlag gelöst, ausgefällt mit HgJ_2JK-HCl. Filtrat wieder gefällt mit 2 Volumina Alkohol; in getrocknetes, gewogenes Filter gesammelt, getrocknet 0,064 g Glykogen.

Gesamtkörper ohne Leber.

580,2 − 14,3 = 565,9 g. 254,1 g Brei + 260 g 60proz. KOH siedend auf Wasserbad bis gelöst, gefällt mit 2 Volumina Alkohol, in Wasser gelöst, mit HgJ_2JK-HCl gefällt, Filtrat wieder gefällt mit 2 Volumina Alkohol; es wurden gefunden 0,188 g Glykogen;

in 565,9 g Körpergemisch . . . . . 0,419 g Glykogen
in der Leber. . . . . 0,064 g „
im ganzen . . . . 0,483 g Glykogen im Körper des Tieres.

Fett.

52,19 g Körperbrei (ohne Leber) gelöst in 30 ccm 60proz. KOH (heiß), in Scheidetrichter mit 70 ccm 38proz. HCl;
es wurden erhalten 2,339 g Fettsäuren;
somit in 100 g Körperbrei 4,482 g,
in 565,9 g Körperbrei 25,36 g Fettsäuern (ohne Leber).

Stickstoff.

a) 16,08 g Körpergemisch (ohne Leber) verbrannt, Lösung aufgefüllt zu 499,334 ccm, enthalten 769,7 mg N, 100 g Körpergemisch (ohne Leber) enthalten 4,825 g N.

b) 18,49 g Körpergemisch (ohne Leber) verbrannt, Lösung aufgefüllt zu 499,96 ccm, enthalten 0,8857 bzw. 0,9099 g N, Mittel 897,8 mg N; 100 g Körpergemisch enthalten 4,790 bzw. 4,921 g N, Mittel 4,855 g N.

100 g Körpergemisch (ohne Leber) enthalten im Mittel 4,840 g N, 565,9 g Körpergemisch (ohne Leber) enthalten 27,38 g N.

Zum Schlusse stelle ich die wesentlichen Ergebnisse nochmals in einer Tabelle zusammen:

Tier	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4
Getötet am	2. XII.	8. I.	1. II.	15. V.
Gewicht	1047,3 g	1061,9 g	423,6 g	580,2 g
Gesamttrockensubstanz (ohne Leber)	58,38 Proz.	50,60 Proz.	42,29 Proz.	39,60 Proz.
Ätherextraktfreie Trockensubstanz im Körper (ohne Leber) total	24,36 Proz.	21,95 Proz.	28,72 Proz.	35,12 Proz.
Glykogen in der Leber	0,387 g	0,198 g	0,181 g	0,064 g
Glykogen im übrigen Körper	1,342 g	0,972 g	0,606 g	0,419 g
Glykogen im übrigen Körper total	1,729 g	1,170 g	0,787 g	0,483 g
Ätherextrakt i. Körper (ohne Leber)	34,02 Proz.	28,65 Proz.	15,57 Proz.	4,48 Proz.
Ätherextrakt i. Körper (ohne Leber) total	348,1 g	297,4 g	63,59 g	25,36 g
Stickstoffgehalt im Körper (ohne Leber)	3,044 Proz.	3,093 Proz.	4,233 g	4,840 Proz.
Stickstoffgehalt im Körper (ohne Leber) total	31,16 g	32,10 g	17,29 g	27,38 g
Lebergewicht	23,9 g 2,3 Proz.	23,8 g 2,2 Proz.	15,2 g 3,6 Proz.	14,3 g 2,5 Proz.

Versuche über die Nachweisbarkeit immunisatorisch bedingter Fermentprozesse. III.

Von

Ernst Kupelwieser und Ernst Navratil.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 2. April 1925.)

In der zweiten Mitteilung dieser Publikationsreihe[1]) wurde über Versuche berichtet, welche die Frage der Nachweisbarkeit einer spezifischen, fermentativen Auflösung fester Substrate durch das Serum antianaphylaktischer[2]) Meerschweinchen behandeln. Jene Versuche hatten ein eindeutig negatives Ergebnis und führten zu dem Schluß, man müsse die Untersuchungen in der Richtung der von *H. Sachs* in dieser Frage vertretenen Anschauung fortsetzen[3]). Sie besagt, daß es sich bei den proteolytischen Prozessen, die unter Umständen in Gemischen von Immunserum und dem zugehörigen Antigen auftreten sollen, um eine unspezifische Serumautolyse handle, die in spezifischer Weise nur ausgelöst wird durch die in solchen Immungemischen ablaufende spezifische Eiweiß-Antieiweißreaktion. Diese ist daran geknüpft, daß man das Antigen in flüssiger, möglichst unveränderter Form in das Reaktionssystem einführt, und ihr Zustandekommen kann bei der Verwendung des Antigens in Form eines festen „Substrats" nicht erwartet werden. Es ist daher das Gegebene, weitere Versuche mit einer Methode anzustellen, die an Stelle des bei der bisher angewandten Refraktometer-

---

[1]) *E. Kupelwieser* und *H. Wastl*, diese Zeitschr. **145**, 505, 1924.

[2]) Als Immunserum wurde deshalb das Serum *antianaphylaktischer* Meerschweinchen genommen, weil nach *H. Pfeiffer* und *S. Mita* (s. Zeitschr. f. Immunitätsforschung **6**, 18, 1910) die Verwendung solchen Serums eine serologisch besonders günstige Bedingung für das Zustandekommen der sogenannten *Abderhalden*-Reaktion darstellt.

[3]) Zusammenfassende Darstellung *H. Sachs*, Kolloidzeitschr. **24**, 113, 1919.

methode[1]) unvermeidlichen makroheterogenen Reaktionssystems ein mikroheterogenes setzt. Ehe jedoch über diese Versuche berichtet wird, sollen die Refraktometerversuche eine Ergänzung erfahren, die aus folgenden Gründen angezeigt erschien.

1. *H. Pfeiffer* und *S. Mita*[2]) hatten bei ihren Versuchen, und zwar gerade bei denen, die sie für das Vorkommen der fraglichen Fermentprozesse als beweisend mitteilen, *Pferdeserum* zur Sensibilisierung verwendet, während wir aus äußeren Gründen Rinderserum genommen hatten. Außerdem berichtet *E. Zunz*[3]) in einer Reihe von Arbeiten, welche die positiven Befunde *Pfeiffers* im allgemeinen bestätigen, daß er bei Verwendung von Meerschweinchen als Versuchstiere und Rinderserum als Antigen zu keinem bestätigenden Ergebnis kam. Es schien uns daher zur Stütze unserer oben erwähnten Schlußfolgerung notwendig, unsere Versuche mit jenem Antigen zu wiederholen, mit dem *Pfeiffer* und *Mita* die stärksten positiven Ausschläge erzielt hatten und dessen Brauchbarkeit nicht von anderer Seite angezweifelt wird.

2. Rinderserum hat dem Meerschweinchen gegenüber bei parenteraler Einverleibung bekanntlich eine starke Eigengiftigkeit, so daß man es vor der Injektion „inaktivieren" muß. Dies taten wir auch, indem wir es vor Gebrauch 30 Minuten lang bei einer Temperatur von $+ 56^0$ C hielten. Pferdeserum hat dem Meerschweinchen gegenüber diese Eigenschaft nicht und kann ohne weiteres auch in größeren Mengen injiziert werden. Es ist nun sehr naheliegend, daß die serologischen Bedingungen für das Zustandekommen der gesuchten Fermentreaktion bei Verwendung eines genuinen Antigens günstigere sind, so daß uns auch aus diesem Grunde die Wiederholung unserer Versuche mit Pferdeserum als Antigen wünschenswert war.

3. *F. Pregl* hatte uns darauf hingewiesen, daß der größere oder geringere Lipoidgehalt des Substrats eventuell verantwortlich gemacht werden könne für die Nichtreproduzierbarkeit seiner mit der Refraktometermethode erzielten positiven Resultate[4]). Das Rinderserumtrockenprotein (R. S.), das wir bei den Versuchen der zweiten Mitteilung verwendet hatten, war sehr lipoidarm. Zu den folgenden Versuchen stellten wir aus Pferdeserum zwei Trockenproteine her, deren eines relativ lipoidarm, deren anderes relativ lipoidreich war, um durch Parallelversuche den allfälligen Einfluß dieses Umstandes auf den Ausfall der Versuche zu erfahren:

---

[1]) *E. Kupelwieser*, diese Zeitschr. **131**, 413, 1922.
[2]) *H. Pfeiffer* und *S. Mita*, Zeitschr. f. Immunitätsforschung **6**, 18, 1910.
[3]) *E. Zunz*, ebendaselbst **17**, 241, 265 und 279, 1913.
[4]) *F. Pregl* und *M. de Crinis*, Fermentforschung **2**, 58, 1917.

Die aus den angeführten Gründen unternommene Versuchsreihe sei nun kurz beschrieben.

Herstellung der Substrate.

1. Ein Normalpferdeserum wurde am 6. Februar 1924 steril gewonnen und bis zum nächsten Tage im Auffangzylinder kühl und vor Licht geschützt aufbewahrt. Dann wurde das Serum abpipettiert, von den dabei aufgeschwemmten Blutkörperchen durch Zentrifugieren befreit. Genau nach der von *L. Löhner*[1]) gegebenen Vorschrift wurde dann ein Trockenprotein hergestellt, welche Herstellung 4 Tage beanspruchte.

Dieses infolge der gründlichen Extraktion mit Alkohol und Äther relativ lipoidarme Präparat war ein weißes Pulver, das sich mit Wasser gut benetzte. Wir bezeichnen es im folgenden mit „P. $S._k$".

2. Am 18. Februar 1924 wurde ein Normalpferdeblut steril gewonnen und zur Serumgewinnung analog wie oben behandelt. Dann wurde aus dem Serum ein Trockenprotein wie folgt hergestellt:

> 200 ccm des Serums, mit 800 ccm angesäuerten (Essigsäure) Wassers verdünnt, am Wasserbad bei + 95° C mit Essigsäure gefällt, unter Zusatz von kaltem Wasser abgekühlt und filtriert.

---

[1]) *L. Löhner*, Zeitschr. f. Fermentforschung **5**, 41, 1921. Die dort (S. 44) gegebene Vorschrift lautet:

„Zur Herstellung der Serumtrockenproteine schlug ich, freundlichen Ratschlägen Prof. *F. Pregls* folgend, einen Weg ein, der sich dem *Pregl*schen Verfahren (*F. Pregl*, Zeitschr. f. Fermentforschung **1**, 10, 1916) zur Darstellung von Organtrockenproteinen für die *Abderhalden*-Reaktion anlehnt.

Die abgemessene Serummenge (200 ccm) wird mit vier Teilen destillierten Wassers (800 ccm) auf das fünffache Volumen gebracht, mit 1 ccm 2proz. Essigsäure angesäuert, in Hartglaskolben abgefüllt und durch eine Viertelstunde im kochenden Wasserbad erhitzt. Daselbst wird dann bis zum scharfen Fällungspunkt tropfenweise 2proz. Essigsäure zugefügt, der Niederschlag absitzen gelassen und dann filtriert (wasserklares Filtrat!). Der Filterrückstand wird mehrere Male mit kochendem, angesäuertem Wasser nachgewaschen und dann zur Lipoidentziehung in weithalsigen Pulvergläsern mit dem gleichen Volumen 96proz. Alkohols versetzt. Nach mehrmaligem Abkolieren, Zerkleinern des Niederschlages in der Reibschale und Erneuern des Alkohols während 24 Stunden wird am zweiten Tage der Niederschlag zuerst mit einem ⅓-Äther-Alkohol-, später mit einem ½-Äther-Alkoholgemisch, am dritten Tage mit reinem Äther versetzt, bis entnommene Ätherproben keinerlei Rückstand mehr ergeben. Am vierten Tage wird der abgenutschte, auf Filtrierpapier abgeklatschte Niederschlag zwischen Filtrierpapier abgepreßt, in der Reibschale nach Anfeuchten mit Alkohol, später Wasser gut zerdrückt und dann zum Zwecke des Ninhydrinfreikochens, geteilt in zwei 500-ccm-Kolben, abgefüllt. Nach dreimaligem halbstündigen Auskochen mit Wasserwechsel und mehrstündigem Stehenlassen in der Zwischenzeit erweisen sich filtrierte Proben des letzten Waschwassers vollkommen rückstandsfrei und genügen den Anforderungen der verschärften *Abderhalden*schen Ninhydrinreaktion. Der so vorbehandelte Niederschlag wird der Reihe nach in Alkohol, Alkohol-Äther und Äther entwässert, luftgetrocknet, eventuell noch zerkleinert und nach Sterilisation im Dampftopf, im Schwefelsäureexsikkator oder noch besser in zugeschmolzenen Röhrchen aufbewahrt."

Der nasse Filterrückstand zentrifugiert, dann in Porzellanschalen mit viel Wasser gewaschen; neuerdings filtriert und der noch nasse Rückstand zentrifugiert.

In Alkohol aufgeschwemmt und zentrifugiert; so zweimal.

Dann noch einmal in Alkohol aufgeschwemmt und etwa 10 Minuten geschüttelt. Hierauf den Alkohol abgenutscht; so noch einmal.

Dann auf der Nutsche mit Alkohol, Alkohol-Äther und Äther nachgewaschen und in Äther aufgeschwemmt.

10 Minuten in diesem Äther geschüttelt, dann wieder auf der Nutsche mit Äther, Alkohol-Äther, Alkohol und schließlich mit destilliertem Wasser behandelt.

In etwa 1 Liter destillierten Wassers aufgeschwemmt und bei dreimaligem Wasserwechsel dreimal kurz aufgekocht.

Zum Schlusse mit Alkohol, Alkohol-Äther und Äther auf der Nutsche getrocknet und etwaige größere Brocken in der Reibschale zerrieben.

Die Herstellung dieses Präparats war innerhalb eines Tages beendet. Dieses gegenüber dem nach der *Löhner*schen Vorschrift hergestellten [1]) relativ lipoidreiche Trockenprotein war ein weißes Pulver, welches sich aber etwas weniger gut mit Wasser benetzte. Wir bezeichnen es mit „P. S.$_n$“.

Prüfung der Substrate.

A. Prüfung der spontanen Löslichkeit der Substrate [2]).

1. Prüfung des Kochwassers.

In kleine, unter besonderen Vorsichtsmaßregeln gereinigte und getrocknete Eprouvetten wurden je 0,04 g Substrat eingewogen. Dann wurden je 2 ccm destillierten Wassers zugesetzt, und die so beschickten Röhrchen blieben nun 1 Stunde lang bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurde ihr Inhalt 1 Minute lang gekocht, worauf sie noch 30 Minuten stehen gelassen wurden. Hierauf wurde filtriert und in je einem Tropfen der Brechungsindex der Filtrate bestimmt. (Durch einen Vorversuch war sichergestellt worden, daß die verwendeten Filter keine merklichen Mengen löslicher Bestandteile abgaben.)

Die Ergebnisse der Prüfung sind in der Tabelle I unter Δ_1 eingetragen: $\Delta_1 = n_D$ des Kochwassers $- n_D$ des destillierten Wassers, der vor und nach dem Versuch bestimmt wurde.

2. Prüfung der Löslichkeit in physiologischer Kochsalzlösung bei Zimmertemperatur.

In die Mikroreaktionsgefäße [3]) wurden je 0,01 g Substrat eingewogen, dann je 0,5 ccm 0,86proz. NaCl-Lösung zugesetzt. Die Gläschen wurden mit Glasstopfen und Paraffin verschlossen und 24 Stunden bei Zimmertemperatur (etwa $+19^0$ C) stehen gelassen, dabei zeitweise gemischt.

---

[1]) Vgl. die in Anm. 1 vor. Seite beschriebene gründlichere Lipoidextraktion *Löhners*.

[2]) Methodik siehe S. 76, Anm. 1 a. a. O., S. 434ff.

[3]) Siehe ebendaselbst, S. 433, Abb. 1.

Ergebnis unter Δ_2 eingetragen: $\Delta_2 = n_D$ der Versuchsflüssigkeit — n_D der NaCl-Lösung.

3. Prüfung der Löslichkeit in einer schwach alkalischen NaCl-Lösung bei Zimmertemperatur (Bedingungen der Abbauprüfung).

100 ccm der 0,86proz. NaCl-Lösung enthielten 0,1 ccm einer n Sodalösung. Die Lösung war also in bezug auf ihren Gehalt an Na_2CO_3 n/1000.

Ergebnis unter Δ_3 eingetragen (analog wie bei 2.).

Tabelle I.

Geprüftes Präparat	Δ_1	Δ_2	Δ_3
P. S.$_k$	0,000 00	0,000 00	— 0,000 01
	+ 0,000 01	0,000 00	+ 0,000 02
P. S.$_n$	0,000 00	+ 0,000 02	+ 0,000 01
	0,000 00	+ 0,000 02	+ 0,000 01

Wie man sieht, liegen sämtliche Werte innerhalb der Fehlergrenzen einer n_D-Bestimmung[1]): Eine spontane Löslichkeit der Substrate unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen war also nicht zu konstatieren.

B. Prüfung der Abbaufähigkeit der Substrate.

Je 0,01 g Substrat wurden in die Mikroreaktionsgefäße eingewogen. Nach Zusatz von siedender physiologischer NaCl-Lösung kamen die so beschickten Röhrchen für 30 Minuten auf das siedende Wasserbad und blieben dann noch mindestens ebenso lange bei Zimmertemperatur stehen. Von dem während dieser Zeit gequollenem Substrat wurde die NaCl-Lösung abgesaugt. Hierauf wurden je 0,5 ccm der Fermentlösung zugesetzt. Nach gründlichem Mischen und kurzem Zentrifugieren wurde dann in einer Probe von 0,05 ccm der Brechungsindex (n_{D1}) bestimmt. Während 24 Stunden blieben nun die Reaktionsgefäße wohlverschlossen bei Zimmertemperatur liegen. Dann wurde neuerlich gemischt, zentrifugiert und in einer zweiten Probe wieder der Brechungsindex (n_{D2}) bestimmt.

Zimmertemperatur + 15,5 bis + 19,5° C.

Versuchsausführung nach Zeiteinteilung I[2]).

Als Ferment benutzten wir ein Trypsin (*Merck*) in drei Konzentrationen:

a) 0,1 Proz. Trypsin in 0,86proz. NaCl-Lösung;

b) 0,01 Proz. Trypsin in 0,86proz. NaCl-Lösung;

c) 0,001 Proz. Trypsin in 0,86proz. NaCl-Lösung.

Alle drei Fermentlösungen mit $^1/_{1000}$ Normalgehalt Na_2CO_3.

---

[1]) Fehlergrenze der n_D-Bestimmung: ± 0,000 02; siehe S. 76, Anm. 1, a. a. O., S. 427ff.

[2]) Alles Nähere über die Ausführung von Abbauversuchen siehe ebendaselbst S. 461ff.

Wir prüften mit diesen Fermentlösungen die Abbaufähigkeit der beiden neuen Substrate P. S.$_k$ und P. S.$_n$, sowie zum Vergleich des Rinderserumtrockenprotein R. S., das bei den Versuchen der zweiten Mitteilung verwendet worden war.

Das Ergebnis der Prüfung ist in Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II.

Substrat	Trypsinkonzentration Proz.	n_{D_1}	n_{D_2}	$n_{D_2} - n_{D_1}$
R. S.	0,1	1,334 91	1,335 90	+ 0,000 99
	0,01	1,334 85	1,334 96	+ 0,000 11
	0,001	1,334 79	1,334 84	+ 0,000 05
P. S.$_k$	0,1	1,334 90	1,336 09	+ 0,001 19
	0,01	1,334 86	1,335 10	+ 0,000 24
	0,001	1,334 79	1,334 86	+ 0,000 07
P. S.$_n$	0,1	1,334 91	1,336 24	+ 0,001 33
	0,01	1,334 86	1,335 16	+ 0,000 30
	0,001	1,334 78	1,334 83	+ 0,000 05

Man bemerkt, daß die beiden neuen Substrate unter den gleichen Versuchsbedingungen abbaufähiger sind als das Präparat R. S.; ferner sieht man, daß das lipoidärmere P. S.$_n$ abbaufähiger ist als das lipoidreichere und bei seiner Herstellung stärker insultierte Präparat P. S.$_k$. Auch bei nur 0,001 proz. Trypsinkonzentration ist noch ein Abbau zu bemerken, wenn da auch die Ausschläge knapp an der Fehlergrenze liegen und sich die Unterschiede in der Abbaufähigkeit der drei Substrate verwischen[1]).

Beschreibung der Versuche.

Die *Vorbehandlung* der Versuchstiere (Meerschweinchen) geschah in der Art, wie sie in der zweiten Mitteilung[2]) S. 507 beschrieben ist, mit dem Unterschied, daß hier das als Antigen verwendete Pferdeserum in nativem Zustande zu den Injektionen verwendet wurde. Ferner hielten wir in allen Fällen zwischen der letzten der drei Injektionen und der Reinjektion ein Intervall von 15 Tagen und zwischen der letzten Reinjektion und der Blutgewinnung ein Intervall von 6 Tagen ein. Zur Untersuchung nahmen wir nur Immunsera von solchen Tieren, die nach der ersten Reinjektion einen durch den entsprechenden Temperatursturz konstatierten, deutlichen anaphylaktischen Schock überlebt hatten und durch ihr Verhalten nach der zweiten (eventuell dritten) Reinjektion zeigten, daß sie sich im antianaphylaktischen Zustande befanden.

---

[1]) Die früher vorgenommenen Prüfungen der Abbaufähigkeit einiger Substrate (darunter auch des R. S.) — s. S. 453 und 470 ff. der S. 76, Anm. 1, angeführten Vorarbeit — sind mit den hier mitgeteilten nicht direkt vergleichbar, da sie mit einem anderen, wahrscheinlich wirksameren Trypsinpräparat und unter anderen Versuchsbedingungen ausgeführt sind.

[2]) Siehe S. 75, Anm. 1.

Die Tabelle III gibt einen Überblick über die Vorbehandlung und das Verhalten der Versuchstiere.

Tabelle III.

Immuntier	Geschlecht	Anfangsgewicht g	Endgewicht g	Vorbehandlung	Intervall zwischen letzter Injektion u. 1. Reinjektion in Tagen	1. R.-I. (aktives Pferdeserum intraperitoneal) ccm	Temperaturreaktion: Temperatur vor d. 1. R.-I.	Temperaturreaktion: Tiefste Temperatur nach der 1. R.-I.	2. R.-I. (24 Std. nach der 1. R.-I., sonst wie 1. R.-I.)	Temperaturreaktion: Temperatur vor d. 2. R.-I.	Temperaturreaktion: Temperatur nach d. 2. R.-I.	Intervall v. d. 2. R.-I. bis zur Serumgewinnung in Tagen
I	♂	397	404	An 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 0,01 ccm aktives Pferdeserum intraperitoneal	15	2,0	37,9	34,5	2,0	37,2	36,9	6
II	♂	477	467			2,0	38,2	35,0	2,0	37,7	37,4	
III	♂	439	460			2,5	38,4	35,4	2,5	38,4	38,4	
V*)	♂	344	345			3,0	38,3	34,2	3,0	38,2	34,4	
VII	♂	344	386			3,0	37,9	35,1	3,0	38,4	38,0	
VIII	♂	412	435			3,0	38,3	32,0	3,0	38,4	37,9	
IX	♂	344	380			3,0	37,1	35,2	3,0	38,1	37,7	
X	♂	507	545			4,0	38,0	31,9	4,0	38,0	37,7	
XII	♀	397	400			2,0	38,0	34,5	2,0	38,4	39,1	
XIII	♀	462	440			2,5	38,1	33,0	2,5	38,2	37,6	
XIV	♀	405	360			2,5	38,3	31,8	2,5	38,2	37,7	
XVI	♂	400	352			3,0	38,0	30,3	3,0	38,4	38,1	

*) Da bei diesem Tier (V) die Temperaturreaktion nach der zweiten Reinjektion zeigte, daß es noch nicht den Zustand der Antianaphylaxie erreicht hatte, wurde 24 Stunden nach der zweiten Reinjektion eine dritte Reinjektion mit der gleichen Serummenge vorgenommen. Nunmehr ergab die Temperaturreaktion (Temperatur vor der dritten R.-I. 38,8° C; extremste Temperatur nach der dritten R.-I. 38,4° C), daß auch dieses Tier antianaphylaktisch war. Das Intervall von der dritten R.-I. bis zur Serumgewinnung betrug 5 Tage.

Gewinnung der Immunsera. Am sechsten Tage nach der zweiten Reinjektion wurden die Tiere unter den Vorsichten der Asepsis aus der Arteria carotis entblutet; das Blut wurde in sterilen Zentrifugiergläschen, die mit ebenfalls sterilen Deckeln aus reinem Nickel versehen waren, aufgefangen und nachdem es geronnen war, 10 Minuten lang zentrifugiert. Das abpipettierte Serum wurde dann in sterilen und wohlverschlossenen Gläschen bis zum Versuchsbeginn bei der Temperatur des fließenden Wasserleitungswassers (+ 8 bis + 10° C) aufbewahrt.

Bezüglich der *Ausführung der Untersuchungen* verweisen wir auf die zweite Mitteilung, S. 508.

Außer den Immunsera wurden zur Kontrolle eine Anzahl von Normalmeerschweinchensera unter den gleichen Versuchsbedingungen untersucht.

Die nun folgende *tabellarische Zusammenstellung* enthält in Tabelle IV die Angaben über die Versuche mit Normalserum und deren Ergebnisse, in Tabelle V die analogen Daten zu den Versuchen mit Immunserum.

Tabelle IV.

Normalserum („N. S.“)	Blutentnahme	Zentrifugiert	Versuchsbeginn	Versuchsdauer	Versuchstemperatur °C	Temperatur des Temperierbades in °C bei der n_D-Bestimmung 1	2	Substrat	Normalserumversuch Nr.	Skala$_1$	n_{D_1}	Skala$_2$	n_{D_2}	$n_{D_2} - n_{D_1}$
	31. III. 1924					+ 17,5								
N. S. I ♂	9h a	9h 30′ a	10h 15′ a	23 Stdn. 15 Min.	+ 20, + 20, + 20			Serum allein		43,68	1,344 14	43,70	1,344 15	+ 0,000 01
						± 0,05	± 0,08	P. S.$_k$	1	42,50	3 69	42,40	3 65	— 0,000 04
									2	42,74	3 78	42,71	3 77	— 0,000 01
									3	42,75	3 78	42,70	3 77	— 0,000 01
								P. S.$_n$	4	42,70	3 77	42,71	3 77	0,000 00
									5	42,58	3 72	42,46	3 67	— 0,000 05
	31. III. 1924													
N. S. II ♂	9h 10′ a	9h 30′ a	3h 30′ p	25 Stunden	+ 20, + 20, + 19			Serum allein		44,62	1,344 49	44,67	1,344 51	+ 0,000 02
						± 0,04	± 0,06	P. S.$_k$	6	43,49	4 07	43,43	4 04	— 0,000 03
									7	43,50	4 07	43,42	4 04	— 0,000 03
								P. S.$_n$	8	42,77	3 79	42,73	3 78	— 0,000 01
									9	43,44	4 05	43,32	4 00	— 0,000 05
									10	43,27	3 98	43,12	3 93	— 0,000 05

N. S. III ♀	10h a	10h 15′ a	10h 40′ a	24 Stunden	+ 21, + 20, + 20	± 0,08	± 0,07	Serum allein		45,78	1,344 92	45,81	1,344 93	+ 0,000 01
								P. S.$_k$	11	44,33	4 38	44,33	4 38	0,000 00
									12	44,62	4 49	44,60	4 48	— 0,000 01
								P. S.$_n$	13	44,26	4 36	44,36	4 39	+ 0,000 03
									14	44,29	4 37	44,29	4 37	0,000 00
									15	44,94	4 61	44,86	4 58	— 0,000 03
N. S. IV ♀	4. IV. 1924 9h 45′ a	10h 15′ a	4h 30′ p	24 Stunden	+ 20, + 20, + 20	± 0,08	± 0,06	Serum allein		47,15	1,345 43	47,23	1,345 46	+ 0,000 03
								P. S.$_k$	16	45,28	4 73	45,30	4 74	+ 0,000 01
									17	45,40	4 78	45,40	4 78	0,000 00
									18	45,20	4 70	45,10	4 67	— 0,000 03
								P. S.$_n$	19	45,63	4 86	45,67	4 88	+ 0,000 02
									20	45,21	4 71	45,21	4 71	0,000 00
N. S. V ♂	7. IV. 1924 11h a	12h a	4h 30′ p	24 Stunden	+ 19, + 20, + 20	± 0,09	± 0,05	Serum allein		42,31	1,343 62	42,32	1,343 62	0,000 00
								P. S.$_k$	21	40,89	3 08	40,89	3 08	0,000 00
									22	41,12	3 17	40,98	3 12	— 0,000 05
								P. S.$_n$	23	40,75	3 03	40,74	3 03	0,000 00
									24	40,81	3 06	40,83	3 06	0,000 00
									25	40,55	2 96	40,48	2 93	— 0,000 03
N. S. VI ♀	7. IV. 1924 10h 15′ a	10h 30′ a	10h 45′ a	24 Stunden	+ 20, + 19, + 20	± 0,08	± 0,05	Serum allein		48,90	1,346 08	48,91	1,346 09	+ 0,000 01
								P. S.$_k$	26	47,29	5 48	47,29	5 48	0,000 00
									27	47,15	5 43	47,12	5 42	— 0,000 01
									28	47,10	5 41	47,00	5 37	— 0,000 04
								P. S.$_n$	29	47,24	5 46	46,71	5 26	— 0,000 20
									30	46,99	5 37	47,00	5 37	0,000 00

Tabelle V.

Immunserum („I. S.“)	Blutentnahme	Zentrifugiert	Versuchsbeginn	Versuchsdauer	Versuchstemperatur °C	Temperatur d. Temperierbades bei der 1. n_{D}-Bestimm. °C	2. n_{D}-Bestimm. °C	Substrat	Immunserumversuch Nr.	Skala₁	n_{D_1}	Skala₂	n_{D_2}	$n_{D_2}-n_{D_1}$
I. S. I	12. III. 1924					+ 17,5		Serum allein		45,84	1,344 94	46,30	1,345 11	+ 0,000 17
	10h a	10h 30′a	3h 45′p	24 St.	+ 20, 20, 21	± 0,05	± 0,03	P. S.k	1	44,09	4 29	44,05	4 28	— 0,000 01
								P. S.k	2	43,80	4 18	43,86	4 21	+ 0,000 03
								P. S.n	3	43,52	4 08	43,62	4 12	+ 0,000 04
								P. S.n	4	43,23	3 97	43,34	4 01	+ 0,000 04
I. S. II	13. III. 1924							Serum allein		45,23	1,344 71	45,38	1,344 77	+ 0,000 06
	8h 45′a	9h a	10h a	24 St.	+ 20, 21, 20	± 0,02	± 0,04	P. S.k	5	43,43	4 04	43,54	4 08	+ 0,000 04
								P. S.k	6	42,55	3 71	42,62	3 74	+ 0,000 03
								P. S.n	7	43,86	4 21	43,96	4 24	+ 0,000 03
								P. S.n	8	43,60	4 11	43,70	4 15	+ 0,000 04
I. S. III	14. III. 1924							Serum allein		44,93	1,344 60	44,85	1,344 57	— 0,000 03
	10h a	10h 30′a	4h p	23 St. 40 Min.	+ 20, 21, 20	± 0,04	± 0,06	P. S.k	9	43,51	4 07	43,63	4 12	+ 0,000 05
								P. S.k	10	43,20	3 96	43,24	3 97	+ 0,000 01
								P. S.n	11	43,49	4 07	43,39	4 03	— 0,000 04
								P. S.n	12	43,61	4 11	43,46	4 05	— 0,000 06
I. S. V	16. III. 1924							Serum allein		47,20	1,345 45	47,23	1,345 46	+ 0,000 01
	9h 45′a	12h	5h p	24 St.	+ 19, 21, 20	± 0,09	± 0,05	P. S.k	13	46,33	5 12	46,24	5 09	— 0,000 03
								P. S.k	14	45,90	4 96	45,92	4 97	+ 0,000 01
								P. S.n	15	46,94	5 35	46,64	5 24	— 0,000 11
								P. S.n	16	46,63	5 23	46,64	5 24	+ 0,000 01
I. S. VII	18. III. 1924							Serum allein		45,12	1,344 67	45,19	1,344 70	+ 0,000 03
	9h 30′a	10h a	4h 30′p	23 St.	+ 20, 17, 18	± 0,07	± 0,04	P. S.k	17	43,46	4 05	43,46	4 05	0,000 00
								P. S.k	18	43,52	4 08	43,47	4 06	— 0,000 02

	9h a	9h 40' a	10h 30' a	22 St.	+ 18, 17, 18	± 0,07	± 0,06	P. S.$_k$	21	41,13	3 18	41,13	3 18	0,000 00
									22	41,81	3 43	41,69	3 38	— 0,000 05
								P. S.$_n$	23	41,51	3 32	41,51	3 32	0,000 00
									24	41,68	3 38	41,69	3 38	0,000 00
I. S. IX	20. III. 1924							Serum allein		47,25	1,345 46	47,20	1,345 45	— 0,000 01
	12h	12h 30' p	3h p	22 St.	+ 20, 19, 18	± 0,09	± 0,05	P. S.$_k$	25	45,58	4 84	45,72	4 90	+ 0,000 06
									26	45,72	4 90	45,73	4 90	0,000 00
								P. S.$_n$	27	45,67	4 88	45,58	4 84	— 0,000 04
									28	45,32	4 75	45,38	4 77	+ 0,000 02
I. S. X	21. III. 1924							Serum allein		46,13	1,345 05	46,13	1,345 05	0,000 00
	9h 30' a	9h 45' a	10h 15' a	23 St.	+ 20, 18, 18	± 0,08	± 0,09	P. S.$_k$	29	44,86	4 58	44,85	4 57	— 0,000 01
									30	44,75	4 54	44,67	4 51	— 0,000 03
								P. S.$_n$	31	44,34	4 39	44,34	4 39	0,000 00
									32	44,41	4 41	44,50	4 44	+ 0,000 03
I. S. XII	23. III. 1924							Serum allein		45,93	1,344 97	45,81	1,344 93	— 0,000 04
	9h a	9h 30' a	10h a	23 St.	+ 18, 20, 18	± 0,05	± 0,07	P. S.$_k$	33	44,39	4 40	44,41	4 41	+ 0,000 01
									34	44,42	4 41	44,46	4 43	+ 0,000 02
								P. S.$_n$	35	43,89	4 22	43,89	4 22	0,000 00
									36	44,21	4 34	44,13	4 31	— 0,000 03
I. S. XIII	24. III. 1924							Serum allein		50,22	1,346 58	50,26	1,346 60	+ 0,000 02
	11h 30' a	12h	3h 15' p	24 St. 15 Min.	+ 19, 17, 19	± 0,06	± 0,1	P. S.$_k$	37	48,46	5 92	48,48	5 93	+ 0,000 01
									38	48,88	6 08	48,79	6 04	— 0,000 04
								P. S.$_n$	39	48,98	6 11	48,75	6 03	— 0,000 08
									40	49,25	6 21	49,20	6 20	— 0,000 01
I. S. XIV	25. III. 1924							Serum allein		47,94	1,345 73	47,94	1,345 73	0,000 00
	10h a	10h 15' a	10h 30' a	23 St. 30 Min.	+ 18, 19, 19	± 0,07	± 0,02	P. S.$_k$	41	46,54	5 20	46,50	5 18	— 0,000 02
									42	46,45	5 17	46,42	5 15	— 0,000 02
								P. S.$_n$	43	46,11	5 04	46,00	5 00	— 0,000 04
									44	46,86	5 32	46,85	5 31	— 0,000 01
I. S. XVI	27. III. 1924							Serum allein		48,62	1,345 98	48,66	1,345 99	+ 0,000 01
	11h a	11h 30' a	3h 15' p	24 St.	+ 20, 20, 20	± 0,1	± 0,05	P. S.$_k$	45	47,47	5 55	47,35	5 50	— 0,000 05
									46	47,40	5 52	47,30	5 48	— 0,000 04
								P. S.$_n$	47	47,57	5 59	47,50	5 56	— 0,000 03
									48	47,70	5 64	47,61	5 60	— 0,000 04

Ergebnis.

Eine Durchsicht der letzten Spalten der Tabellen IV und V läßt erkennen, daß, mit Ausnahme von drei Werten, sämtliche Werte innerhalb der anläßlich der Ausarbeitung der Methodik festgelegten Fehlergrenzen eines mit diesem Verfahren ausgeführten Fermentversuchs liegen[1]). Von den drei auffallend großen Werten ergab sich der eine (— 0,00020) bei einem Kontrollversuch (Nr. 29): Normalserum + P. $S._k$, der zweite (+ 0,00017) bei einem Kontrollversuch (J. S. I): Immunserum allein, und der dritte (— 0,00011) bei einem Hauptversuch (Nr. 15): Immunserum + P. $S._n$; also auch unter diesen Ausnahmefällen kommt keiner vor, der auf eine fermentative Auflösung des Substrats im Immunserum hinwiese. Es sind diese drei aus der Reihe fallenden Werte nichts anderes als abnormal große Versuchsfehler, wie sie selbst bei sorgfältigster Ausführung einer Methode gelegentlich vorkommen. Im ganzen macht sich weder zwischen den Versuchen mit Normalserum und denen mit Immunserum, noch zwischen den Versuchen mit dem einen und dem anderen Substrat ein Unterschied in den Ergebnissen bemerkbar. Kein einziges Resultat spricht für das Vorkommen einer fermentativen Auflösung der Substrate oder eines der beiden Substrate in einem der Immunsera.

Ebenso wie bei den Versuchen der ersten beiden Mitteilungen haben wir auch hier eine statistische Auswertung der ganzen Versuchsreihe vorgenommen, um etwaige positive Ausschläge, selbst wenn sie nur von der Größenordnung der Versuchsfehler gewesen wären, zu erfassen.

Die Fehlerrechnung ergibt:

$$M_a = +\ 9 \,.\, 10^{-6} \pm 4 \,.\, 10^{-6}$$
$$M_b = -\ 14 \,.\, 10^{-6} \pm 3 \,.\, 10^{-6}$$
$$M_c = -\ 9 \,.\, 10^{-6} \pm 3 \,.\, 10^{-6}$$

wobei wir wieder mit M_a, M_b und M_c die Mittelwerte aus allen Versuchen a) mit Serum allein, b) mit Normalserum + Substrat und c) mit Immunserum + Substrat bezeichnen und bei jedem dieser Mittelwerte seinen wahrscheinlichen Fehler angeben.

Man sieht, daß die Ausschläge der Versuche mit Substrat im Durchschnitt negative sind, sowie daß sie bei den Normal- und bei den Immunserumversuchen als gleich zu bezeichnen sind. Der Mittelwert der Ausschläge bei den Versuchen mit Serum allein liegt etwas höher.

---

[1]) Der Fehlerbereich der Fermentversuche wurde mit $\pm 0{,}00005$ ermittelt; im allgemeinen können n_D-Zunahmen von 0,00010 angefangen, als positive Versuchsergebnisse gelten. Siehe S. 76, Anm. 1, a. a. O., S. 462ff. und S. 472.

Als Ergebnis ist also zu verzeichnen, daß eine fermentative Auflösung der koagulierten Substrate in den Immunsera auch nicht bis zu einer Größenordnung der wahrscheinlichen Mittelwertsfehler stattgefunden hat. [Im ungünstigsten Falle hätten regelmäßige Ausschläge von durchschnittlich + 0,000011 (+ 11 . 10^{-6}) sich bereits in einer entsprechenden, das Bereich der wahrscheinlichen Mittelwertsfehler überschreitenden Verschiebung von M_c gegen M_b bemerkbar machen müssen.]

Zusammenfassung.

In Ergänzung der in der zweiten Mitteilung[1]) dieser Publikationsreihe beschriebenen Versuche wurden Meerschweinchen mit aktivem Pferdeserum als Antigen vorbehandelt und ihre während des antianaphylaktischen Zustandes gewonnenen Sera mittels der Refraktometermethode (Mikro-Abderhaldenreaktion) auf das Vorkommen spezifischer, gegen das Antigen der Vorbehandlung gerichteter proteolytischer Fermente untersucht.

Das Ergebnis der ganzen Versuchsreihe (12 Immunsera, 48 Versuche mit zwei Substraten verschiedenen Lipoidgehalts, sowie den entsprechenden Kontrollversuchen) ist ein eindeutig negatives: In keinem einzigen Falle konnte bei unserer Versuchsanordnung eine spezifische fermentative Auflösung des Substrats festgestellt werden, noch ergab die statistische Auswertung des ganzen Versuchsmaterials auch nur den geringsten Anhaltspunkt für das Vorkommen einer derartigen Reaktion.

---

[1]) *E. Kupelwieser* und *H. Wastl*, diese Zeitschr. **145**, 505, 1924.

Versuche über die Nachweisbarkeit immunisatorisch bedingter Fermentprozesse. IV.

Von

Ernst Kupelwieser und I. Wilhelm.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 2. April 1925.)

In drei vorangegangenen Mitteilungen wurde über das völlige Versagen der sogenannten Mikro-Abderhaldenreaktion[1]) berichtet. Sowohl bei den Versuchen mit menschlichem Schwangerenserum[2]), wie bei jenen mit Serum antianaphylaktischer Meerschweinchen, die mit Rinder-[3]) bzw. mit Pferdeserum[4]) sensibilisiert worden waren, konnte in keinem einzigen Falle eine fermentative Auflösung des spezifischen Substrats gefunden werden. Dies, obwohl zu den versuchten serologischen Schwangerschaftsnachweisen drei verschiedene Placentapräparate und bei den zuletzt angeführten Versuchen zwei Pferdeserumtrockenproteine von verschiedenem Lipoidgehalt als Substrate benutzt wurden, obwohl die große Abbaufähigkeit aller verwendeten Substrate durch Vorversuche einwandfrei festgestellt war und obwohl die Versuchsmethodik sich auf eine vorangegangene quantitative Ermittlung ihrer Fehlerquellen stützte[5]). Zudem hatte sich die Refraktometermethode — wenn man sie unter Einhaltung der durch die methodische Vorarbeit festgelegten Vorsichtsmaßregeln

---

[1]) *F. Pregl* und *M. de Crinis*, Fermentforschung **2**, 58, 1917.

[2]) *E. Kupelwieser*, diese Zeitschr. **145**, 492, 1924 (erste Mitteilung dieser Publikationsreihe).

[3]) *E. Kupelwieser* und *H. Wastl*, ebendaselbst **145**, 505, 1924 (zweite Mitteilung).

[4]) *E. Kupelwieser* und *E. Navratil*, ebendaselbst **160**, 75, 1925 (dritte Mitteilung).

[5]) *E. Kupelwieser*, ebendaselbst **131**, 413, 1922.

handhabte — bei ihrer Anwendung zu anderen Zwecken[1]) als hochempfindliches und zuverlässiges Verfahren zum Nachweis und zur quantitativen Verfolgung proteolytischer Vorgänge erwiesen.

Die in drei Versuchsreihen mit einer wohlgefestigten Methodik erhobenen ausnahmslos negativen Befunde schienen zu dem Schluß zu berechtigen, daß die nicht konstatierbare fermentative Auflösung der koagulierten Antigene durch das Immunserum auch nicht stattfindet. Indessen erschien bald nach dem Abschluß der Refraktometerversuche eine Arbeit[2]) aus dem Laboratorium *Pincussens* (Berlin), die auf einen Umstand hinweist, der in unserem Versuch eine Rolle als Fehlerquelle gespielt haben konnte. In dieser Arbeit wird unter anderem untersucht, ob Eiweißabbauprodukte von den nach *Pregl* hergestellten Eiweißsubstraten absorbiert werden. Während kristalloide Eiweißabbauprodukte nur sehr wenig absorbiert wurden, zeigte sich bei den ersten Abbaustufen eine erhebliche Adsorption; so werden Versuche mitgeteilt, bei denen 2 ccm einer 0,1 proz. wässerigen Lösung von Pepton (*Witte*) bei 24 stündigem Kontakt mit 0,2 g Placentatrockenprotein 37 Proz. ihres mit der Mikro-Kjeldahlmethode (nach *Pincussen*) bestimmten Stickstoffgehalts einbüßte.

Es war nun daran zu denken, daß bei unseren Refraktometerversuchen ein doch stattgehabter fermentativer Abbau der Substrate sich dem Nachweis deshalb entzogen haben könnte, weil die entstehenden Abbauprodukte durch Adsorptions seitens des noch nicht gelösten Substratanteils verhindert wurden in Lösung zu gehen und der Brechungsindex der Systemflüssigkeit aus diesem Grunde unverändert blieb. Da diese Möglichkeit entscheidend ist für die Deutung unserer negativen Befunde, mußte untersucht werden, ob und inwieweit diese Fehlerquelle bei unserer Versuchsanordnung von Einfluß auf das Ergebnis sein kann. Die im folgenden mitgeteilten Versuche sind der Entscheidung dieser Frage gewidmet.

Versuchsweg.

Da uns eine Adsorption von Eiweißspaltprodukten an die Substrate nur insoweit interessierte, als sie eine Abnahme des Brechungsindex der Systemflüssigkeit bewirken bzw. einer Zunahme entgegenwirken konnte, untersuchten wir, ob der Brechungsindex einer Peptonlösung abnimmt, wenn sie längere Zeit mit einem der festen Substrate in Berührung ist; und zwar wurden als Adsorbentia alle bei den früher

---

[1]) *E. Kupelwieser* und *O. Rösler*, diese Zeitschr. **136**, 38, 1923 (Anwendung zur Untersuchung des Magensafts auf seine eiweißlösende Wirkung).

[2]) *I. H. Cascao de Anciaes*, diese Zeitschr. **144**, 179, 1924. Siehe auch dessen vorläufige Mitteilung in der Klin. Wochenschr. 1924, S. 115.

mitgeteilten Versuchsreihen benutzten Substrate und als Adsorbendum Pepton (*Witte*) verwendet, weil dieses nach *Cascao de Anciaes*[1]) am stärksten adsorbiert wird. Dabei mußte bedacht werden, daß unsere Substrate in Wasser quellen und dadurch einer wässerigen, kolloiden Eiweißlösung einen Teil des Lösungsmittels entziehen, indem sie es als Quellflüssigkeit binden, was im Sinne einer Brechungsindexerhöhung wirkt[2]); da ferner bei den Versuchen zum Fermentnachweis die Substrate in gequollenem Zustand in das Reaktionssystem eingeführt werden, war zu untersuchen, ob sich gequollenes Substrat hinsichtlich der in Frage stehenden Adsorptionserscheinungen etwa anders verhält als ungequollenes. Wie sich weiter unten bei der Versuchsbeschreibung zeigen wird, muß man dazu von der rechnerischen Ermittlung des Brechungsindex von wässerigen NaCl- und Peptonlösungen Gebrauch machen, weshalb durch Vorversuche festzustellen war, ob die Mischregel[3]) auf diese Lösungen angewendet werden darf. Ebenso mußte — ehe die Adsorptionsversuche angestellt wurden — nachgesehen werden, ob unter unseren besonderen quantitativen Bedingungen der Einfluß der Quellflüssigkeit zu berücksichtigen ist, oder ob er vernachlässigt werden kann.

Vorversuche.

1. Über die Gültigkeit der Mischregel[4]): $n = \frac{V_1 . n_1 + V_2 . n_2}{V_1 + V_2}$.

a) für Wasser-Kochsalzgemische.

Versuch vom 29. Januar 1924: Es wurden mittels Büretten, die in 0,01 ccm geteilt waren, Gemische von destilliertem Wasser und physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, welche die beiden Bestandteile in jenen Mengen enthielten, wie sie in der zweiten und dritten Spalte der Tabelle I angegeben sind. Bei $+ 17{,}5 \pm 0{,}1^\circ$ C wurde unter allen nötigen Vorsichtsmaßregeln in einem Tropfen jedes Gemisches der Brechungsindex mit dem Eintauchrefraktometer unter Anwendung des Hilfsprismas bestimmt: n_D.

Aus den ebenso ermittelten Brechungsindices des destillierten Wassers und der Kochsalzlösung wurde nach der obigen Mischregel der Sollwert für die Brechungsindices der Gemische berechnet: $\overline{n_D}$.

In der Tabelle I sind die bei den verschiedenen Gemischen experimentell gefundenen und die für sie aus der Mischregel berechneten Brechungsindices nebeneinander gestellt:

---

[1]) Siehe Anmerkung 2, S. 89.

[2]) Siehe S. 439ff. der unter Anmerkung 5, S. 88, angeführten methodischen Vorarbeit.

[3]) Über die Mischregel und die Bedingungen, unter denen sie gilt, siehe ebendort S. 444ff.; speziell Anmerkung 1.

[4]) Dabei bedeuten: n den Brechungsindex des Gemischs, n_1 und n_2 die Brechungsindices, V_1 und V_2 die Volumina seiner Bestandteile.

Tabelle I.

Nr.	Gemisch von		n_D bestimmt	$\overline{n_D}$ berechnet
	NaCl-Lösung	H_2O		
1	4,00 ccm	0,00 ccm	1,334 74	
2	3,60 „	0,40 „	1,334 60	1,334 59
3	3,20 „	0,80 „	1,334 43	1,334 43
4	2,40 „	1,60 „	1,334 12	1,334 12
5	2,00 „	2,00 „	1,333 98	1,333 97
6	1,60 „	2,40 „	1,333 83	1,333 82
7	0,80 „	3,20 „	1,333 53	1,333 51
8	0,40 „	3,60 „	1,333 37	1,333 35
9	0,00 „	4,00 „	1,333 20	

Man sieht, daß die gefundenen Werte mit den nach der Mischregel berechneten innerhalb der Fehlergrenze einer refraktometrischen n_D-Bestimmung[1]) übereinstimmen; dasselbe hat sich bei der Wiederholung dieses Versuchs und bei der häufigen Anwendung der Mischregel ergeben:

Die Mischregel darf also innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs für die Berechnung der Brechungsindices von wässerigen NaCl-Lösungen angewendet werden.

b) für Wasser-Peptongemische.

Auch für Wasser-Peptongemische wurde die Gültigkeit der Mischregel in Vorversuchen sichergestellt und außerdem wurde sie bei jedem Adsorptionsversuch mit gequollenem Substrat, wo wir sie anwandten, nachgeprüft. Hier geben wir einen Versuch wieder, der zur Kontrolle am Ende der ganzen Versuchsreihe angestellt worden war.

Versuch vom 13. Dezember 1924. Eine am Vortage des Versuchs hergestellte wässerige 0,3proz. Pepton-(*Witte*)-Lösung wurde unmittelbar vor ihrer Verwendung filtriert. Unter allen nötigen Vorsichtsmaßregeln wurde zunächst der Brechungsindex dieser Lösung und der des als Lösungsmittel verwendeten destillierten Wassers bestimmt. Dann wurde eine Reihe von Verdünnungen der 0,3proz. bzw. einer aus ihr bereiteten 0,1proz. Peptonlösung mittels destillierten Wassers hergestellt und deren Brechungsindices ebenfalls bestimmt. Aus dem Brechungsindex der Peptonlösung und dem des destillierten Wassers wurden nun mittels der Mischregel die Sollwerte für die Brechungsindices der Verdünnungen berechnet. (Die Verdünnungen sind mit Pipetten hergestellt, die in 0,1 ccm geteilt waren; die Brechungsindices wurden bei $+ 17{,}5 \pm 0{,}1^0$ C bestimmt.)

In der Tabelle II sind die Zusammensetzungen der Gemische, die gefundenen und die berechneten n_D-Werte eingetragen:

[1]) Über die Ausführung der Brechungsindexbestimmung und deren Fehlergrenze ($\pm$ 0,00002) siehe S. 420ff., bzw. S. 427ff. der in Anmerkung 5 auf S. 88 angeführten Arbeit.

Tabelle II.

Nr.	Gemische	n_D bestimmt	$\overline{n_D}$ berechnet
1	0,3 proz. Peptonlösung allein	1,333 63	
2	2 ccm der 0,3 proz. Peptonlösung + 1 ccm dest. Wasser	1,333 47	1,333 49
3	1 ccm der 0,3 proz. Peptonlösung + 2 ccm dest. Wasser = 0,1 proz. Peptonlösung	1,333 34	1,333 34
4	3,2 ccm der 0,1 proz. Peptonlösung + 0,8 ccm dest. Wasser	1,333 31	1,333 31
5	2,0 ccm der 0,1 proz. Peptonlösung + 2,0 ccm dest. Wasser	1,333 26	1,333 27
6	0,8 ccm der 0,11 proz. Peptonlösung + 3,2 ccm dest. Wasser	1,333 24	1,333 23
7	Destilliertes Wasser allein	1,333 20	

Man ersieht aus der Übereinstimmung der gefundenen und der berechneten n_D-Werte, daß die Mischregel zur Berechnung der Brechungsindices von wässerigen Peptonlösungen (jedenfalls bis zu 0,3 Proz. Peptongehalt) verwendet werden kann.

2. Über die Verminderung der Systemflüssigkeit um den Betrag der Quellflüssigkeit.

Wie wir bei der Ermittlung dieser eventuellen Fehlerquelle vorgingen, sei an einem Beispiel gezeigt:

Versuch vom 2. bis 4. Februar 1924. In zylindrische Reaktionsgefäße, die etwa 10 ccm faßten, und mit eingeschliffenen Glasstopfen zu verschließen waren [1]), wurden je etwa 0,1 g des Rinderserum-Trockenpräparats „R. S.“ [2]) mit der analytischen Wage eingewogen (die bis auf die Zehntel-Milligramme genauen, also in den Milligrammen stimmenden Einwagen sind in der zweiten Spalte der Tabelle III angegeben). Dann wurden mit der in 0,01 ccm eingeteilten Bürette je 3,05 ccm destillierten Wassers vom Brechungsindex 1,333 20 zugesetzt, die Röhrchen wohl verschlossen längere Zeit (bei diesem Versuch etwa 48 Stunden) bei Zimmertemperatur (+ 18 bis + 20° C) stehen gelassen. Während dieser Zeit wurde ihr Inhalt wiederholt durchgemischt.

[1]) Die hier und auch zu den Adsorptionsversuchen verwendeten Reaktionsgefäße waren ähnlich jenen, die S. 433 der methodischen Vorarbeit (siehe S. 88, Anmerkung 5 a. a. O.) beschrieben und abgebildet sind; nur waren sie in allen Abmessungen entsprechend größer. Vor Gebrauch wurden sie — wie ebendort beschrieben — auf Abgabe löslicher Glasbestandteile und guten Verschluß geprüft.

[2]) R. S. ist das bei den Versuchen der zweiten Mitteilung (siehe S. 88, Anmerkung 3) verwendete Substrat.

Nach Ablauf dieser Quellzeit[1]) wurden nach kurzem Zentrifugieren jedem Röhrchen 0,05 ccm Flüssigkeit entnommen und deren Brechungsindex bestimmt: n_{D1}. Man ersieht aus der dritten Spalte der Tabelle III, daß diese Brechungsindices etwas höher sind als der des destillierten Wassers, d. h., daß während der langen Quellzeit geringe Substratmengen in Lösung gegangen sind, was aber den Versuch nicht stört, da diese n_D-Zunahmen in die unten durchgeführte Rechnung mit eingehen.

Nun wurde zu den in jedem Röhrchen zurückgebliebenen 3,00 ccm Flüssigkeit (Quellwasser) je 3,00 ccm einer Kochsalzlösung vom Brechungsindex 1,334 71 zugefügt; nach kurzem Mischen und abermaligem Zentrifugieren wurden nun die Brechungsindices dieser Gemische bestimmt: n_{D2}.

Aus den Brechungsindices (n_{D1}) der Wässer, in denen die Substrate gequollen waren und in denen sie sich spurenweise gelöst hatten, und dem Brechungsindex der Kochsalzlösung konnte man nun unter Anwendung der durch voranstehende Versuche für derartige Gemische gesicherten Mischregel berechnen, welchen Brechungsindex ein Gemisch der Kochsalzlösung mit einem *gleichen* Volumen von jedem dieser Wässer haben müßte: $\overline{n_{D_2}}$.

Die Gemische aber, deren Brechungsindex (n_{D2}) bestimmt worden waren, bestanden, genau genommen, nicht aus gleichen Teilen der Kochsalzlösung und des betreffenden Wassers, sondern aus 3,00 ccm Kochsalzlösung und $(3{,}00 - x)$ ccm des Wassers, wobei x die vom Substrat beim Quellen aufgenommene und als Quellflüssigkeit gebundene Wassermenge bedeutet: Theoretisch müßten also die gefundenen Brechungsindices (n_{D2}) dieser Gemische größer sein als die unter Vernachlässigung von x berechneten n_{D2}.

Tabelle III.

Nr.	Eingewogene R. S.-Menge g	n_{D_1}	n_{D_2}	$\overline{n_{D_2}}$	$\overline{\overline{n_{D_2}}}$
1	0,100	1,333 24	1,333 99	1,333 97	1,333 99
2	0,103	1,333 25	1,333 98	1,333 98	1,334 00
3	0,102	1,333 26	1,3 99	1,333 98	1,334 00
4	0,100	1,333 25	1, 3 97	1,333 98	1,334 00

Die Übereinstimmung der n_{D_2} mit den $\overline{n_{\;\,2}}$ innerhalb der Fehlergrenzen der Brechungsindexbestimmung zeigt, daß die Verminderung der Systemflüssigkeit um den Betrag der vom Substrat aufgenommenen Quellflüssigkeit bei dem hier zwischen Substrat und Systemflüssigkeit herrschenden Mengenverhältnis praktisch vernachlässigt werden kann.

Dasselbe ergab sich für die übrigen Substrate und die Mengenverhältnisse bei unseren Adsorptionsversuchen.

Anhang zum obigen Versuch.

Die vom Substrat pro Gewichtseinheit aufgenommene Menge an Quellflüssigkeit ist in der methodischen Vorarbeit auf einem ganz anderen Wege ermittelt worden[2]).

---

[1]) Die Quellzeit war sehr reichlich bemessen; die Substrate quellen schon in viel kürzerer Zeit vollständig. Siehe die in Anmerkung 5 auf S. 88 angeführte Arbeit, S. 438.

[2]) Siehe ebendaselbst S. 446, Tabelle XIX.

Aus der Brechungsindexzunahme, welche eine bestimmte Menge Serum erfährt, wenn in ihm eine bestimmte Menge Substrat quillt, konnte mit Hilfe der *Annahmen*, daß die Substrate in Wasser und in physiologischer Kochsalzlösung gleich stark quellen, und daß sie beim Quellen in Serum aus diesem eine Flüssigkeit vom Brechungsindex der physiologischen Kochsalzlösung aufnehmen, die Menge der Quellflüssigkeit berechnet werden. Es ergab sich dabei, daß 0,01 g des Substrats R. S. im Durchschnitt 0,014 ccm Quellflüssigkeit aufnehmen. Man kann nun mittels der Mischregel die Sollwerte für die Brechungsindices der obigen Gemische unter Berücksichtigung der vom Substrat aufgenommenen Quellflüssigkeit berechnen, wenn man für das x den Wert einsetzt, der sich aus der auf jenem anderen Wege vorgenommenen Ermittlung der Quellflüssigkeit und den hier verwendeten Substratmengen ergibt.

Der Ansatz dieser Rechnung ist z. B. für Nr. 1 der Tabelle III folgender:

$$\frac{(3{,}00 - 0{,}14) \,.\, 1{,}333\,24 + 3{,}00 \,.\, 1{,}333\,71}{(3{,}00 - 0{,}14) + 3{,}00} = \overline{\overline{n_{D_2}}}$$

und ergibt: $\overline{\overline{n_{D_2}}} = 1{,}333\,99$, ein Wert, der in diesem Falle bis in die letzte Dezimale mit dem zugehörigen, experimentell gefundenen n_{D_2} übereinstimmt.

In analoger Weise wurden unter Zugrundelegung des seinerzeit erschlossenen Wertes für die Quellflüssigkeit die n_D-Sollwerte für die anderen drei Gemische berechnet und als „$\overline{\overline{n_{D_2}}}$“ der Tabelle III hinzugefügt. Auch bei ihnen ist die Übereinstimmung mit den gefundenen Werten eine sehr bemerkenswerte, ein Beweis, daß der für die Quellflüssigkeit auf ganz anderem Wege und auf Grund bestimmter Annahmen erschlossene Wert verläßlich und die Menge der Quellflüssigkeit tatsächlich so gering ist, daß sie hier vernachlässigt werden darf.

Adsorptionsversuche mit ungequollenem Substrat.

Beschreibung der Versuche. Von den auf ihr Adsorptionsvermögen zu untersuchenden Substraten wurden 0,1 oder 0,2 g in die S. 92 erwähnten Reaktionsgefäße eingewogen; dann wurden 1,5 bzw. 3,0 ccm einer 0,1proz. wässerigen Pepton-(*Witte*)-Lösung zugesetzt. Die so beschickten Reaktionsgefäße blieben nun wohlverschlossen bei Zimmertemperatur (in der Tabelle IV angegeben) während längerer Zeit stehen („Versuchsdauer“); während dieser Zeit wurde ihr Inhalt wiederholt durchgemischt. Am Ende der Versuchszeit wurde nach kurzem Zentrifugieren jedem System eine Flüssigkeitsprobe entnommen und in ihr der Brechungsindex bestimmt.

Die Peptonlösung war immer am Vortag des Versuchs hergestellt und vor dem Versuchsbeginn filtriert worden. Zu Beginn und am Ende des Versuchs wurde ihr Brechungsindex bestimmt, während der Versuchszeit stand sie unter denselben Bedingungen wie die Systeme.

Solche Versuche wurden mit allen jenen Trockenorganproteinen angestellt, die bei den Versuchen der vorangegangenen Mitteilungen als Substrate verwendet worden waren; also mit den drei Placentapräparaten: Plac. I, Plac. II und Plac. III (erste Mitteilung), ferner mit dem Rinderserumpräparat: R. S. (zweite Mitteilung) und mit den beiden Pferdeserumpräparaten: P. S.$_k$ und P. S.$_n$ (dritte Mitteilung). Da von den Placentapräparaten nur sehr geringe Mengen zur Verfügung standen, konnten mit ihnen die Adsorptionsversuche nur mit geringeren absoluten Mengen bzw. in geringerer Zahl angestellt werden.

Gelegentlich kam es vor, daß sich der Brechungsindex der Peptonlösung während der Versuchszeit in einem die Fehlergrenze der n_D-Bestimmungen überschreitendem Maße geändert hatte; wenn auch der Brechungsindex des Systems dann meist den dieser Änderung entsprechenden Wert angenommen hatte, so war die Beurteilung der Versuche dadurch doch erschwert. Diese Versuche wurden daher verworfen und es werden hier nur jene mitgeteilt, bei denen der Brechungsindex der Peptonlösung (wie aus der Tabelle IV ersichtlich ist) während der Versuchszeit innerhalb der Fehlergrenzen der n_D-Bestimmungen gleich geblieben war[1]).

Die Zusammenstellung in Tabelle IV umfaßt diese Versuche.

Versuchsergebnis. Man sieht, daß die Brechungsindices der Systemflüssigkeiten bei Versuchsende, das sind also die Brechungsindices der Peptonlösung, in der die Substrate gequollen und mit der sie während der Versuchsdauer in Kontakt gewesen sind, innerhalb der Fehlergrenzen der n_D-Bestimmungen dieselben sind wie die Brechungsindices der Peptonlösungen, die mit den Substraten nicht in Berührung gekommen waren.

Da die Verminderung der Systemflüssigkeit um die Menge der Quellflüssigkeit keine merkliche n_D-Zunahme bewirkt (s. Vorversuch 2), so hätte eine merkliche Adsorption von Pepton an die Substrate infolge der damit verbundenen Konzentrationsabnahme eine Abnahme des n_D der Systemflüssigkeit gegenüber dem n_D der unveränderten Peptonlösung nach sich ziehen müssen. Auch die Möglichkeit eines durch die spontane Löslichkeit der Substrate bedingten gegenläufigen Fehlers ist durch frühere (s. die in Anmerkung 5, S. 88, zitierte Vorarbeit und die dritte Mitteilung) und neue (s. S. 93 und Tabelle V) Löslichkeitsprüfungen ausgeschlossen.

Da aber die betreffenden Brechungsindices miteinander übereinstimmen, so kann man sagen:

Unsere ungequollenen Substrate adsorbieren während des Quellens und nachher Pepton nicht, oder doch nur in einem so geringen Ausmaß, daß dies bei den in unseren Versuchen herrschenden Mengenverhältnissen keinen merklichen Einfluß auf den Brechungsindex der Systemflüssigkeit hat.

Adsorptionsversuch mit gequollenem Substrat.

Beschreibung der Versuche. Hier wurden von den Substraten 0,1 oder 0,2 g in die Reaktionsgefäße eingewogen und 1,1 bzw. 2,1 ccm destillierten Wassers zugesetzt. Während einer in der Tabelle V (unter Quelldauer) angegebenen Zeit blieben die Substrate zum Quellen im destillierten Wasser.

[1]) Die n_D-Bestimmungen sind in der gleichen Weise und unter denselben Vorsichtsmaßregeln bei + 17,5 ± 0,1° C ausgeführt, wie bei den Versuchen der früheren Mitteilungen (s. die in Anmerkung 5, S. 88, angegebene Arbeit, S. 420ff.). Wir benutzten dazu das *Pulfrich*sche Eintauchrefraktometer Nr. 13807 (Zeiss) mit Hilfsprisma (kleiner Ausschliff), welches auch bei den früher mitgeteilten Versuchen in Verwendung stand, sowie ein neues, etwas moderneres Instrument: Nr. 20702 (Zeiss), das auf gleichen Wasserwert (n_D eines Leitfähigkeitswassers = 1,33320 bei + 17,5 ± 0,1°C) justiert worden war und Bestimmungen innerhalb derselben Fehlergrenzen gestattete, wie sie in der oben angeführten Arbeit für ein anderes, älteres Instrument angegeben sind.

Tabelle IV.

Nr.	System: Substrat	System: Systemflüssigkeit	Versuchsdauer Std.	Temperatur bei Versuchsbeginn + °C	Temperatur bei Versuchsende + °C	0,1 proz. Peptonlösung bei Versuchsbeginn: Skala	0,1 proz. Peptonlösung bei Versuchsbeginn: n_D	0,1 proz. Peptonlösung bei Versuchsende: Skala	0,1 proz. Peptonlösung bei Versuchsende: n_D	Systemflüssigkeit bei Versuchsende: Skala	Systemflüssigkeit bei Versuchsende: n_D
1	0,1 g Plac. I	1,5 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	23 1/2	19,5	19	15,38	1,333 34	15,40	1,333 35	15,40	1,333 35
2	0,1 g Plac. II	1,5 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	23 1/2	19,5	19	15,38	1,333 34	15,40	1,333 35	15,42	1,333 36
3	0,2 g Plac. III	3 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	24	19,5	19,5	15,38	1,333 34	15,39	1,333 35	15,40	1,333 35
4	0,2 g R. S.	3 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	24	20	18,5	15,39	1,333 35	15,37	1,333 34	15,37	1,333 34
5	0,2 g R. S.	3 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	24	20	18,5	15,39	1,333 35	15,37	1,333 34	15,36	1,333 34
6	0,2 g P. S.$_k$	3 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	23	19	17,5	15,34	1,333 33	15,36	1,333 34	15,33	1,333 32
7	0,2 g P. S.$_k$	3 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	23	19	17,5	15,34	1,333 33	15,36	1,333 34	15,34	1,333 33
8	0,2 g P. S.$_n$	3 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	23	16,5	16	15,35	1,333 33	15,37	1,333 34	15,36	1,333 34
9	0,2 g P. S.$_n$	3 ccm 0,1 proz. Peptonlösung	23	16,5	16	15,35	1,333 33	15,37	1,333 34	15,34	1,333 33

Tabelle V.

Nr.	System: Substrat	System: Systemflüssigkeit	Quelldauer Std.	Versuchsdauer Std.	Temperatur bei Versuchsbeginn	Temperatur bei Versuchsende	Quellwasser: Skala	Quellwasser: n_D	0,3 proz. Peptonlösung bei Versuchsbeginn: Skala	0,3 proz. Peptonlösung bei Versuchsbeginn: n_D	0,3 proz. Peptonlösung bei Versuchsende: Skala	0,3 proz. Peptonlösung bei Versuchsende: n_D	n_D eines Gemisches v. 2 Tl. Quellwasser u. 1 Teil 0,3 proz. Peptonlösung berechnet	Systemflüssigkeit bei Versuchsende: Skala	Systemflüssigkeit bei Versuchsende: n_D gefunden
10	0,1 g Pl. I	1 ccm Quellw. u. 0,5 ccm 0,3 proz. Peptonlösung	2	22 1/2	19	17,5	15,03	1,333 21	16,20	1,333 66	16,24	1,333 67	1,333 36	15,38	1,333 34
11	0,1 g Pl. II	1 ccm Quellw. u. 0,5 ccm 0,3 proz. Peptonlösung	1 1/2	24	20	20,5	15,03	1,333 21	16,18	1,333 65	16,20	1,333 66	1,333 36	15,42	1,333 36
12	0,2 g Pl. III	2 ccm Quellwasser und 1 ccm 0,3 proz. Peptonlösung	3 1/2	25	19	18,5	15,03	1,333 21	16,17	1,333 64	16,19	1,333 65	1,333 35	15,40	1,333 35
13	0,2 g R. S.	2 ccm Quellwasser und 1 ccm 0,3 proz. Peptonlösung	5	24 1/2	18,5	18,5	15,06	1,333 22	16,12	1,333 62	16,10	1,333 62	1,333 35	15,35	1,333 33
14	0,2 g R. S.	2 ccm Quellwasser und 1 ccm 0,3 proz. Peptonlösung	5 1/2	24 1/2	18,5	18,5	15,04	1,333 21	16,12	1,333 62	16,10	1,333 62	1,333 35	15,37	1,333 34
15	0,2 g P. S.$_k$	2 ccm Quellwasser und 1 ccm 0,3 proz. Peptonlösung	4 1/2	22 1/2	21	19	15,03	1,333 21	16,16	1,333 64	16,19	1,333 65	1,333 35	15,37	1,333 34
16	0,2 g P. S.$_k$	2 ccm Quellwasser und 1 ccm 0,3 proz. Peptonlösung	5	22 1/2	21	19	15,00	1,333 20	16,16	1,333 64	16,19	1,333 65	1,333 35	15,38	1,333 34
17	0,2 g P. S.$_n$	2 ccm Quellwasser und 1 ccm 0,3 proz. Peptonlösung	4	23	16,5	16	15,00	1,333 20	16,10	1,333 61	16,14	1,333 63	1,333 34	15,35	1,333 34
18	0,2 g P. S.$_n$	2 ccm Quellwasser und 1 ccm 0,3 proz. Peptonlösung	4 1/2	23	16,5	16	15,00	1,333 20	16,10	1,333 61	16,14	1,333 63	1,333 34	15,36	1,333 34

Dann wurden nach kurzem Zentrifugieren jedem Gläschen 0,1 ccm dieses „Quellwassers" entnommen und dessen Brechungsindex bestimmt, um zu sehen, ob die Substrate etwa merkliche Mengen löslicher Bestandteile abgegeben hatten. (Man sieht an den in der Tabelle V angegebenen n_D-Werten der Quellwasser, daß dies nicht der Fall war.) Nun wurden zu dem nach der Probeentnahme zurückgebliebenen 1,0 bzw. 2,0 ccm Wasser 0,5 bzw. 1,0 ccm einer 0,3proz. Peptonlösung zugesetzt, dann wurden diese Systeme in den Reaktionsgefäßen wohlverschlossen bei Zimmertemperatur während der „Versuchsdauer" stehengelassen und in dieser Zeit einigemal umgeschüttelt. Am Ende der Versuchsdauer wurde der Brechungsindex der Systeme bestimmt. Andererseits war der Brechungsindex der 0,3proz. Peptonlösung vor Beginn und am Ende des Versuchs ermittelt worden, und man konnte nun mittels der Mischregel — deren Anwendbarkeit auf diese Gemische durch die Vorversuche 1b gesichert war — berechnen, welchen Brechungsindex ein Gemisch von zwei Teilen jedes Quellwassers und einem Teil der 0,3proz. Peptonlösung haben sollte. Nebenbei wurde durch Herstellung entsprechender Gemische der 0,3proz. Peptonlösung mil destilliertem Wasser bei jedem Versuch die Gültigkeit der Mischregel nachgeprüft.

In Tabelle V sind die Angaben zu diesen Versuchen zusammengestellt.

Versuchsergebnis. Da der von den Substraten als Quellflüssigkeit gebundene Anteil der Systemflüssigkeit zu vernachlässigen ist (s. die Vorversuche 2), mußte der am Ende des Versuchs gefundene Brechungsindex der Systemflüssigkeit dem berechneten Brechungsindex einer 0,1proz. Peptonlösung gleich sein, *wenn* die Substrate das Pepton *nicht* merklich adsobiert hatten. Aus einem Vergleich der berechneten und gefundenen n_D-Werte, welche in der Tabelle hervorgehoben sind, ergibt sich nun, daß tatsächlich keine merkliche Adsorption stattgefunden hat.

Die Versuche zeigen also, daß auch die gequollenen Substrate das Pepton unter den hier eingehaltenen quantitativen Verhältnissen nicht merklich adsorbieren.

Ergebnis.

Unsere Trockenproteine: Plac. I, II und III, sowie R. S., P. $S._k$ und P. $S._n$ adsorbieren weder beim Quellen, noch in vorgequollenem Zustand aus einer 0,1proz. Peptonlösung Peptonmengen, die unter unseren Versuchsbedingungen eine merkliche Brechungsindexabnahme der Systemflüssigkeit bewirken würden.

Das Mengenverhältnis zwischen Substrat und Systemflüssigkeit war bei den Adsorptionsversuchen 0,1 bzw. 0,2 g Substrat in 1,5 bzw. 3,0 ccm Systemflüssigkeit, also umgerechnet auf eine zehnfach geringere Substratmenge: 0,01 g Substrat in 0,15 ccm Systemflüssigkeit. Bei den früher mitgeteilten Versuchen (siehe Mitteilung I, II und III) zur Frage der Nachweisbarkeit immunisatorisch bedingter Fermentprozesse bestanden die Reaktionssysteme aus 0,01 g Substrat und 0,45 oder 0,5 ccm Systemflüssigkeit. Substrat und Systemflüssigkeit standen also dort in einem Mengenverhältnis, bei dem ein Adsorptionsvorgang, der sich unter den seiner Nachweisbarkeit hier viel günstigeren Bedingungen

der Beobachtung entzieht, einen merklichen Einfluß auf den Brechungsindex erst recht nicht haben konnte. Da nach den Angaben von *I. H. Cascao de Anciaes* (vgl. S. 89) die gröber dispersen ersten Eiweißabbauprodukte, wie Pepton, welches hier untersucht wurde, mehr adsorbiert werden als die tieferen Abbaustufen, so gilt für diese das oben Gesagte um so mehr. Es kommen daher Adsorptionserscheinungen seitens der Substrate als Fehlerquelle für die in den ersten drei Mitteilungen beschriebenen Versuche nicht in Betracht.

Zusammenfassung.

Bei drei früher mitgeteilten Versuchsreihen[1]) war es in keinem Falle gelungen, mittels der Refraktometermethode [Mikro-Abderhaldenreaktion[2])] eine fermentative Auflösung der koagulierten, spezifischen Eiweißsubstrate durch menschliches Schwangerenserum bzw. durch das Serum sensibilisierter Meerschweinchen nachzuweisen. Durch eine Arbeit von *I. H. Cascao de Anciaes*[3]) über das Adsorptionsvermögen von derartigen Eiweißsubstraten gegenüber den beim Eiweißabbau zuerst entstehenden Spaltprodukten wurden wir darauf aufmerksam gemacht, daß dieses Versagen der Mikro-Abderhaldenreaktion etwa damit erklärt werden könne, daß die unter der Einwirkung der postulierten spezifischen Fermente doch entstehenden Abbauprodukte von dem noch nicht abgebauten Substratanteil adsorbiert und dadurch verhindert würden, in Lösung zu gehen. So wäre es erklärlich gewesen, daß ein möglicherweise stattgehabter Abbau sich der Beobachtung entzogen haben könnte.

Um festzustellen, ob bei den oben angeführten früheren Refraktometerversuchen diese Fehlerquelle einen entscheidenden Einfluß auf das Ergebnis und damit auf die Deutung ihres negativen Ausfalls haben konnte, stellten wir unter Einhaltung entsprechender quantitativer Bedingungen mit den früher verwendeten Substraten Adsorptionsversuche an. Sie ergaben zwingend, daß die in Erwägung gezogene Deutungsmöglichkeit nicht in Betracht kommt.

Die früher erhobenen, ausnahmslos negativen Befunde berechtigen also — gestützt durch die hier mitgeteilte Untersuchung — zu dem Schluß, daß die mit einer durch Berücksichtigung der quantitativ ermittelten[4]) Fehlerquellen wohlgefestigten Refraktometermethodik niemals festgestellte spezifische Auflösung der Eiweißsubstrate auch tatsächlich nicht stattgefunden hat.

---

[1]) Siehe S. 88, Anmerkung 2 bis 4.
[2]) Siehe S. 88, Anmerkung 1.
[3]) Siehe S. 89, Anmerkung 2.
[4]) Siehe S. 88, Anmerkung 5.

Anhang.

E. Kupelwieser: Bemerkung zur Arbeit von *M. Serejski*[1]).

Der genannte Autor bestätigt meine (I. Mitteilung) bezüglich der Schwangerschaftsreaktion erhobenen negativen Befunde, macht es mir aber zum Vorwurf, daß ich aus ihnen nicht schloß, es gäbe keine spezifischen Abwehrfermente. Ich hatte dort auf Fehlermöglichkeiten hingewiesen, die nach dem damaligen Stand meiner Versuche nicht auszuschließen waren, und sagte am Schluß jener ersten Mitteilung: „Dieses (negative) Ergebnis meiner Versuche steht in Widerspruch mit den günstigen Erfahrungen, die *Pregl* und *de Crinis* beim serologischen Schwangerschaftsnachweis mit der Methode gemacht haben. Als Erklärung hierfür scheinen mir zunächst folgende zwei Möglichkeiten in Betracht zu kommen: Entweder die Reproduzierbarkeit der Mikro-Abderhaldenreaktion hängt von noch nicht aufgeklärten Umständen ab oder aber, es kommen spezifisch gegen Placenta eingestellte Serumfermente, wie sie die Lehre *Abderhaldens* fordert, in späteren Stadien der Schwangerschaft (aus äußeren Gründen hatte ich nur Sera von Schwangeren in den letzten drei Lunarmonaten untersucht) nicht regelmäßig vor.“

Serejski hält meinen Hinweis auf diese noch zu berücksichtigenden Möglichkeiten für den Ausdruck meiner Enttäuschung über den negativen Ausfall jener Versuche und meint, seine Versuche (*Serejski* hatte Schwangerensera auch aus früheren Stadien der Schwangerschaft untersucht) „beweisen zur Genüge die Grundlosigkeit derartiger Spekulationen“.

Demgegenüber halte ich an der Berechtigung meines damaligen Schlußsatzes fest, da man doch *zunächst* an derartige Möglichkeiten zu denken verpflichtet ist, ehe man die Arbeiten anderer, die von positiven Resultaten berichten, einfach als falsch erklärt. Daß die Ablehnung der Mikro-Abderhaldenreaktion (nach *Pregl* und *de Crinis*) erst einer weiteren experimentellen Begründung bedurfte und noch entscheidende Fehlermöglichkeiten auszuschließen waren, ist aus unseren weiteren, speziell aus der vorliegenden vierten Mitteilung zu dieser Frage ersichtlich.

Im übrigen ist es mir unverständlich, wie *Serejski* bei der kritischen Durchsicht meiner ersten Mitteilung die im gleichen Heft dieser Zeitschrift unmittelbar angeschlossene zweite Mitteilung entgehen konnte, in der wir schon darauf hingewiesen hatten, daß unsere negativen Versuchsergebnisse gegen die Lehre von den spezifischen (Abwehr-)Fermenten sprechen, zu welcher Einsicht *Serejski* — im Gegensatz zu uns! — gekommen zu sein glaubt.

---

[1]) Diese Zeitschr. **152**, 79, 1924.

Zum experimentellen Teil von *Serejskis* Arbeit ist zu bemerken, daß die Größenordnung seiner Versuchsfehler um mindestens eine Zehnerpotenz hätte verkleinert werden können, wenn er sich an unsere, seinerzeit ausführlich begründeten Vorschriften für die Ausführung derartiger Versuche[1]) gehalten hätte. Ferner ist richtigzustellen, was *Serejski* (S. 87 seiner Arbeit) bezüglich einer angeblichen Adsorption eines Teiles des Serums seitens des Substrats anführt. Es hat *nichts* mit Adsorption zu tun, wenn man den Brechungsindex eines Serums, das mit einem in physiologischer Kochsalzlösung vorgequollenem Substrat in Berührung stand, niedriger findet als den Brechungsindex des Serums allein, vielmehr ist diese Erscheinung in sehr einfacher Weise dadurch zu erklären, daß die dem Substrat als Benetzungsflüssigkeit anhaftende Kochsalzlösung[2]) eine Verdünnung des Serums bewirkt und der Brechungsindex dieses verdünntem Serums niedriger ist als der des unverdünnten.

---

[1]) Siehe die **S. 88,** Anmerkung 5 angeführte methodische Vorarbeit.

[2]) Siehe in derselben Arbeit das S. 442ff. über die „Benetzungsflüssigkeit“ Gesagte.

Zur Bewertung der Lehmannschen Mikroelektrode.

Von

G. E. Wladimiroff und M. J. Galwialo.

(Aus dem Laboratorium der physiologischen Chemie an der Militär-Medizinischen Akademie zu Leningrad.)

(Eingegangen am 20. April 1925.)

Die Notwendigkeit, die Wasserstoffionenkonzentration in sehr geringen Mengen der zu untersuchenden Flüssigkeit zu bestimmen, hat eine ganze Reihe von Mikroelektroden ins Leben gerufen. Eine von den scharfsinnigsten und in ihrer Konstruktion einfachsten ist die von *Lehmann*[1]) für einen Tropfen des Versuchsmaterials vorgeschlagene Mikroelektrode.

Die *Lehmann*sche Mikroelektrode stellt ein einige Zentimeter langes Glasröhrchen von 1½ cm Durchmesser vor. Die Röhre ist von beiden Seiten mit Gummistopfen verschlossen. Durch den unteren Stopfen ist ein den Wasserstoff zuführendes Glasröhrchen und ein Glasstäbchen geführt, an welches ein Deckgläschen angeschmolzen ist (in unserer Elektrode ist das ein trichterförmiges Schälchen), auf welches der untersuchte Tropfen gebracht wird. In dem oberen Stopfen befinden sich drei Öffnungen: durch die erste ist das Ausführungsröhrchen für den Wasserstoff herausgeführt, durch die zweite ein Röhrchen mit eingeschmolzenem Platindraht, durch die dritte der KCl-Agarheber. Auf den Boden wird etwas Wasser gegossen, um die Ausdünstung des Tropfens zu verringern.

Da wir über die Mikromethode von den Klinikern beständig befragt wurden und sie selber für eigene Untersuchungen notwendig anzuwenden hatten, stellten wir im Sommer und Herbst 1924 eine Reihe vergleichender Bestimmungen der Wasserstoffzahl in verschiedenen Flüssigkeiten an, wir wandten dazu drei Formen der Elektroden an: die übliche Elektrode mit flüssigem Wasserstoff, die Elektrode mit einer konstanten Wasserstoffblase und die Mikroelektrode. Die elektrometrische Vorrichtung, welche wir benutzten, war von dem gewöhnlichen Typus nach *Michaelis*. Als Nullinstrument gebrauchten wir ein empfindliches Spiegelgalvanometer.

---

[1]) Diese Zeitschr. **139**, 213, 1923.

Die Resultate der Bestimmungen können in zwei Gruppen eingeteilt werden.

Zu der ersten gehören die Bestimmungen der Wasserstoffionen in kohlensäurefreien Lösungen. Das Potential wird, wie es *Lehmann* gezeigt hat, rasch und genau festgestellt.

Tabelle I.

Art der Flüssigkeit	p_H		
	Lehmanns Mikroelektrode	Einfache Elektrode m. flüss. H_2	Temperatur
1. Acetatgemisch (CH_3COOH, 0,1 mol., CH_3COONa, 0,1 mol., āā)	4,66	4,67	18°
2. Phosphatgemisch (KH_2PO_4 0,2 mol., Na_2HPO_4 0,2 mol., āā)	6,80	6,81	18
3. Boratgemisch (5,5 ccm Borat, 4,5 ccm HCl, 0,1 mol.)	7,93	7,93	18,5°
4. Borat (H_3BO_3, 0,2 mol., NaOH, 0,1 mol.)	9,21	9,22	18,5

Anders verhalten sich die kohlensäurehaltigen Lösungen. Das Potential stellt sich lange Zeit nicht fest ein, es wird nötig, den Wasserstoff einige Stunden lang hindurchzuleiten, wobei wir in einigen Fällen selbst nach dem Verlauf von 5 Stunden nicht die Sicherheit haben, daß das Potential seine Grenzgröße erreicht hat. Zur Veranschaulichung können folgende Beispiele dienen:

Tabelle II.

Art der Flüssigkeit	In der *Lehmann*schen Mikroelektrode Stunden der Durchleitung							In Elektrode mit konst. H_2	Temperatur
	2	3	4	5	6	7	8		
1. Borat (p_H 9,22) mit CO_2 versetzt	8,42	8,48	—	8,65	—	8,71	8,75	7,11	18,5°
2. Blut (Blutplasma) des Menschen	8,78	8,95	—	9,02	9,03	9,02	—	7,53	13,5
3. Dasselbe	9,02	9,27	—	—	—	9,25	9,21	—	13°
4. Dasselbe *)	8,76	—	9,15	—	9,09	9,07	9,07	—	13
5. Hühnereiweiß am 2. Inkubationstage **) . . .	9,29	9,29	—	—	—	—	—	9,25	19
6. Amnialflüssigkeit des Hühnerembryos am 19. Inkubationstage . .	5,82	5,97	6,26	6,48	—	—	—	5,25	19

*) Vorläufig ist die Verdünnung der Elektrode ausgeführt. — **) Das Eiweiß ist ohne Vorsichtsmaßregeln gegen CO_2 entnommen.

Wie aus der Tabelle II ersichtlich ist, geben das Borat, welches mit Kohlensäure bereichert ist, und die Amnialflüssigkeit des Hühnerembryos die CO_2 sehr langsam ab. Was die Zahlen für das

Blut anbelangt, so müssen folgende vorläufige Bemerkungen in Betracht gezogen werden. Das Blut wurde aus der Fingerkuppe des Menschen durch einen Stich mit der *Francke*schen Nadel entnommen. Zu demselben wurden feinste Kristalle des Oxalatnatriums hinzugesetzt, was das p_H des Blutes wahrnehmbar nicht verändert (*Michaelis*). Während der Bestimmung bildeten die Erythrocyten einen Niederschlag am Boden des kleinen Trichters, so daß eigentlich das p_H des Plasmas und nicht des Blutes bestimmt wurde.

Da das p_H des Blutes, welches von CO_2 befreit ist (Grundwasserstoffzahl) ein besonderes klinisches Interesse bietet [*Ylppö*[1]), *Höber*[2])], weil es den Azidosegrad zu bestimmen erlaubt, so entsteht die Frage, ob die *Lehmann*sche Mikroelektrode für diesen Zweck anwendbar sei. Wir führten einige Bestimmungen ausschließlich mit dem Blute gesunder Menschen aus. Nach lange dauerndem Hindurchleiten von H_2 schwankten die Werte von p_H zwischen 9,02 und 9,27. Für die völlige Entleerung (Evakuation) der CO_2 schlägt *Ylppö* vor, die Blutgase mit der Wasserstrahlpumpe unter gleichzeitigem Schütteln auszupumpen. Wir führten zwei Bestimmungen mit vorläufiger 10 Minuten langer Atmosphärenverdünnung in der Mikroelektrode selbst bis zu 1 cm Hg aus, aber ohne zu schütteln. Wir erhielten dieselben Resultate wie bei der einfachen Durchleitung des H_2 ohne vorläufige Gaseauspumpung. Im allgemeinen ist die genaue Bestimmung des p_H des Blutes in dieser Elektrode recht schwer. Die Bestimmung dauert so lange, daß die Selbstsäuerung des Blutes beginnt [*Michaelis* und *Davidoff*[3])], erfordert viel Zeit, viel Wasserstoff, außerdem bilden die Erythrocyten einen Niederschlag am Boden. Dies alles zusammengenommen, verringert den Wert der *Lehmann*schen Mikroelektrode für diese Fälle auf das minimalste, zumal andere, genauere und weniger weitläufige Methoden der p_H-Bestimmung in kleinen Flüssigkeitsmengen ohne Kohlensäureverlust vorliegen.

Es ist aber eine Gruppe von Objekten vorhanden, bei deren Untersuchung die *Lehmann*sche Mikroelektrode unersetzlich ist. Dies sind sehr zähe Flüssigkeiten und Gallerten. Für die Objekte, welche in der Tabelle III angeführt sind, stellt sich das Potential im Laufe von 2 bis 3 Stunden genau ein, was für so zähe und gallertartige Substanzen nicht als ein langer Termin gelten kann. In diesen Fällen leiteten wir den Wasserstoffstrahl in der Elektrode von oben, um die lebendige Kraft des Wasserstoffstrahls für die schnellere Sättigung des untersuchten Substrats auszunutzen.

---

[1]) Zeitschr. f. Kinderheilk. **14**, 266, 1916.
[2]) Deutsch. med. Wochenschr. **18**, 551, 1917.
[3]) Diese Zeitschr. **46**, 131, 1912.

Tabelle III.

	p_H	Temperatur
1. Hühnereiweiß am 7. Tage der Inkubation (28 Proz. fester Substanz).	7,71	19°
2. „ am 9. Tage (35 Proz. fester Substanz)	7,65	19
3. Muskel des Hühnerembryos am 13. Entwicklungstage	7,49	19
4. „ „ „ am 19. Tage	6,41	19
5. „ „ „ am 20. Tage	6,11	19

Zusammenfassung.

Die Mikromethode von *Lehmann* gibt gute Resultate im Falle von CO_2-freien Flüssigkeiten; im Falle der Flüssigkeiten, welche CO_2 enthalten, steht sie in der Genauigkeit und in der Schnelligkeit der Bestimmung den anderen Methoden nach; sie ist endlich für die Bestimmung des p_H in Gallerten und in Geweben, welche in substantia untersucht werden, außerordentlich bequem.

Zur Stickstoffbestimmung nach D. Acél.

Von

F. Himmerich.

(Aus dem staatlichen Forschungsinstitut für Mutterschafts- und Säuglingsschutz, Moskau. Physiologisch-chemisches Laboratorium.)

(Eingegangen am 26. April 1925.)

Im 121. Bande dieser Zeitschrift veröffentlichte *D. Acél* eine Mikromethodik der Stickstoffbestimmung, die unseres Erachtens in gar mancher Hinsicht sich vorteilhaft von den verschiedenen Mikrokjeldahlverfahren unterscheidet. Es fehlt hier z. B. ganz die Überdestillation des Ammoniaks und damit auch die Gefahr eines Verlustes an letzterem durch diese Operation. Das Verfahren ist recht einfach. Es wird auch kein Katalysator bei der Veraschung gebraucht. Daß letzterer Umstand nicht ohne Bedeutung ist, konnten *Fleury* · und *Levaltier* (1) beim Arbeiten mit dem Makrokjeldahl feststellen: sie hatten beim Gebrauch von Schwermetallsalzen (Hg-, Cu-, Fe-, Cr- und andere Salze) als Katalysator im Destillat einen Verlust von 2 bis 5 Proz. Ammoniak zu verzeichnen. Daß es mit dem Mikrokjeldahl darin besser steht, ist wohl kaum anzunehmen.

Bei der Arbeit mit *Acéls* Methodik machten sich jedoch bald Übelstände bemerkbar, die uns veranlaßten, diese Methodik einer gründlichen Nachprüfung zu unterwerfen.

Unsere Aufmerksamkeit lenkte in dieser Hinsicht zuerst die Seignettesalzlösung auf sich. Diese Lösung empfahl bekanntlich *Winkler* (2) zur Bestimmung von Ammoniak in Trinkwasser mit beträchtlichem Calcium- und Magnesiumgehalt. *Acél* nahm diese Lösung mit einiger Abänderung in seine Methodik auf.

Nimmt man nun, wie *Acél* empfiehlt, 0,3 ccm der Natriumhydroxydlösung, so kommt es recht oft vor, daß nach Hinzufügung der Seignettesalzlösung eine Trübung des Inhalts der Reagenzgläser eintritt. Durch Versuche mit verschiedenen Mengen der reagierenden Substanzen gelang es uns bald, festzustellen, daß diese Trübung ausbleibt, wenn man statt 0,3 ccm nur 0,25 ccm der Natriumhydroxydlösung in das Reagenzglas gibt.

Das ist aber nicht immer die einzige Ursache. Wir hatten z. B. eine Seignettesalzlösung, die noch 18 Tage nach ihrer Zubereitung mit einer 30 Tage alten, nach *Winkler-Treadwell* (3) hergestellten Nesslerlösung eine Trübung auch bei 0,25 ccm Natriumhydroxydlösung hervorrief, während wieder eine andere, um 2 Monate ältere Lösung keine Trübung verursachte. Keine Trübung gab auch eine ex tempore ohne Nesslerreagens zubereitete Seignettesalzlösung. Die Ursache lag hier also in dem zugesetzten Nesslerreagens. Da *Mandel* und *Steudel* (4) darauf hinweisen, daß die Nesslerlösung bei hohem Carbonatgehalt eine Trübung hervorrufen kann, so wurde der Trübung verursachenden Nesslerlösung, die — nebenbei bemerkt — schon 3 Monate alt war, eine gesättigte Bariumhydroxydlösung bis zur Fällung aller Carbonate hinzugegeben und die ursprüngliche Alkalität der Nesslerlösung durch Zusatz von 50proz. Natriumhydroxydlösung wieder annähernd hergestellt. Mit dieser Nesslerlösung wurde nach ihrer vollständigen Klärung eine frische Seignettesalzlösung hergestellt und nach einer Woche erprobt; es kam jedoch wieder zu einer Trübung des Reagenzglasinhalts. Nach *Winkler* (in *Acéls* Wiedergabe) hergestellte Nesslerlösungen gaben ähnliche Resultate.

Solcherlei Unannehmlichkeiten und der Umstand, daß man der Nesslerlösung in Fällen, wo die Empfindlichkeit des Reagens erhöht werden soll, Sublimat hinzugibt [*Treadwell* (5)], bewog uns zu versuchen, die Seignettesalzlösung nicht mit Nesslerlösung, sondern mit Sublimat vor Schimmel zu schützen. Statt warmen destillierten Wassers wurde daher eine warme Sublimatlösung in der Konzentration 1 : 500 genommen und das Seignettesalz (50 g auf 100 ccm) darin gelöst. Diese Lösung wurde filtriert und sogleich erprobt. Es erschien keine Trübung nach Zusatz dieser Lösung; auch nach Hinzufügung der Nesslerlösung blieb der Inhalt der Reagenzgläser stundenlang klar. Die Farbentöne eines solchen Reagenzglases unterschieden sich in nichts von dem Farbenton eines Glases ohne Seignettesalzlösung. Diese Seignettesalzlösung hält sich nun schon über ein halbes Jahr, ohne eine Spur von Schimmel zu zeigen. Bei Versuchen mit Wasser, dem Calciumhydroxyd hinzugefügt war, hat diese Lösung sich bei uns gut bewährt: während ohne diese Lösung sofort nach Hinzufügung des Nesslerreagens eine Trübung des Wassers eintrat, blieb das Reagenzglas mit Seignettesalzlösung stundenlang klar.

Auf Grund früherer Beobachtungen wurden weiter unter Verwendung von veraschtem Blut, Blutfiltrat (nach Eiweißfällung mit Trichloressigsäure), Harn und Harnstofflösungen sowie Ammoniumchloridlösungen Versuche *mit* und *ohne* Anwendung von Seignettesalzlösung angestellt. Es wurden zu diesen Versuchen Seignettesalzlösungen „nach *Acél*“ und mit Sublimat zubereitet genommen. In allen

diesen wiederholt angestellten Versuchen blieben die Reagenzgläser *ohne* Seignettesalzlösung stundenlang gerade so klar, wie jene *mit* Seignettesalz; im Farbenton ließ sich auch kein Unterschied feststellen. Wir kommen daher zu dem Schlusse, daß man bei Stickstoffbestimmungen im Blute und Harne für gewöhnlich auch ohne Seignettesalzzusatz arbeiten kann.

Es ist hier jedoch zu bemerken, daß aus metallenen Destillationsapparaten gewonnenes Wasser auch manchmal eine Trübung nach Hinzufügung des Nesslerreagens verursachen kann. Vertreibung der Kohlensäure durch Kochen des Wassers verbesserte dessen Eigenschaften in unserem Falle nicht, Hinzufügung der Seignettesalzlösung (0,5 ccm zu 10 ccm Wasser) dagegen bewirkte, daß das Ammoniumchlorid enthaltende Wasser nach Hinzufügung der Nesslerlösung klar blieb; wir hatten also „hartes" destilliertes Wasser. Nach einer nochmaligen Destillation mit Kaliumpermanganat im Glaskolben verlor jedoch das Wasser seine Trübung hervorrufenden Eigenschaften, so daß wir auch in diesem Falle ohne Seignettesalzlösung auskommen konnten. Wir möchten daher diese Bearbeitung des gewöhnlichen destillierten Wassers beim Arbeiten nach *Acéls* und wohl auch anderen Mikromethoden sehr empfehlen.

Weiter konnten wir feststellen, daß auch ohne Seignettesalz sich bei einem Zusatz von 0,3 ccm der Natriumhydroxydlösung oft nach Hinzufügung der Nesslerlösung eine schnell folgende Trübung des Reagenzglasinhalts einstellt. Dem kann nach unseren Versuchen auch hier durch eine Verminderung der Natriumhydroxydlösung bis zu 0,25 ccm leicht abgeholfen werden; so behandelte Reagenzgläser bleiben stundenlang klar.

Da konzentrierte Schwefelsäure wegen ihrer großen Viskosität bei so kleiner Menge wie 0,05 ccm sehr unvollkommen an den Wänden der Reagenzgläser hinabläuft, so ziehen wir es vor, sie halb mit destilliertem Wasser zu vermischen, um sie dann in doppelter Menge (0,1 ccm) zu nehmen; auf solche Weise ist sie auch leichter abzumessen. Die hinzugefügten 0,05 ccm Wasser spielen bei der nachfolgenden Veraschung natürlich keine merkbare Rolle.

Die Ammoniumsalzlösung empfiehlt *Acél* in der Kontrollröhre als letzte Lösung nach und nach hinzuzugeben, bis die Farbe der Kontrollröhre ihrer Intensität nach der Farbe der Reagenzröhre mit der veraschten Substanz gleichkommt. In einem großen Prozentsatz aller Fälle erhält man aber dabei verschiedene Farbentöne, was den Vergleich natürlich sehr erschwert. Sich den Versuchsbedingungen im Veraschungsrohr nähernd, versuchten wir nun in der Kontrollröhre die Ammoniumsalzlösung (Ammoniumchlorid) in einer dem Bedarf annähernd entsprechenden Menge sogleich nach der Veraschung der

Schwefelsäure hinzuzufügen, um die Titrierung dann nach Hinzufügung aller Reagenzien zu beenden. Und wirklich, in allen solchen Versuchen erhielten wir in der Kontroll- und den Versuchsröhren *gleichen* Farbenton.

Die eminente Bedeutung dieses Umstandes wird durch folgenden Versuch illustriert: reiner Harnstoff (Firma Kahlbaum) wurde umkristallisiert und zu einer Lösung verwendet, deren Konzentration derart war (21,93 mg Stickstoff in 1 Liter), daß einem 0,5 ccm dieser Lösung 0,548 ccm oder rund 0,55 ccm unserer Ammoniumchloridlösung (20,0 mg Stickstoff in 1 Liter) entsprach. In vier Reagenzgläser wurden je 0,5 ccm der Harnstofflösung zugegeben und nach dem weiter unten beschriebenen Verfahren verascht; nach Zugabe aller Reagenzien färbte sich der Inhalt aller Gläser grün-*gelb*. Es wurden zwei Kontrollröhren gestellt: eine, zu welcher gleich nach der Veraschung der Schwefelsäure 0,55 ccm Ammoniumchloridlösung und eine, zu welcher letztere Lösung erst nach dem Nesslerreagens hinzugegeben wurde. Die Resultate sind aus folgender Tabelle zu ersehen:

Nummer der Versuchsröhre:	1	2	3	4	Mittel	Farbenton der Kontrollröhre
Menge der NH_4Cl-Lösung in erster Kontrollröhre (in ccm)	0,55	0,54	0,56	0,55	0,55	grüngelb
Menge der NH_4Cl-Lösung in zweiter Kontrollröhre (nach *Acél*)	0,65	0,63	0,64	0,64	0,64	graugelb

Man erhält also im zweiten Falle viel zu hohe Stickstoffwerte. Da der Farbenton dieser Kontrollröhre nicht identisch ist mit dem Farbenton der Versuchsröhre, so sind die gefundenen Zahlen der zweiten Reihe zwar als recht subjektiv zu nennen; ein anderer Forscher würde vielleicht bei einem anderen Wert halt gemacht haben. Aber eben diese durch den verschiedenen Farbenton bedingte Unsicherheit und Subjektivität spricht gegen das Verfahren. Gibt man dagegen in die Kontrollröhre die Ammoniumchloridlösung sogleich nach Veraschung der Schwefelsäure, so erhält man Werte mit Schwankungen von nur $\pm$ 1,75 Proz. um den wirklichen Wert. Bei Harnstofflösungen unbekannter (für den Arbeitenden) Konzentration beträgt dieser Fehler unter Einhaltung der hier beschriebenen Arbeitsweise und im Bereiche von 0,01 bis 0,02 mg Stickstoff in 0,5 ccm Flüssigkeit nicht mehr als $\pm$ 3 Proz.

Weiter wurde von uns festgestellt, daß es sehr leicht zu verschiedenen Farbentönen bei Kontroll- und Versuchsrohr kommen kann, wenn sie in ihrer Intensität um mehr als 25 bis 30 Proz. differieren: je mehr man sich beim Hinzufügen der Ammoniumsalzlösung nach Veraschung der Schwefelsäure dem endgültigen Werte nähert, desto

mehr identisch werden die Farbentöne der Kontroll- und Versuchsröhren. Es muß also hier wie auch bei anderen kolorimetrischen Methoden in einem möglichst eng begrenzten Gebiete von Farbenunterschieden zwischen Standard- und Versuchslösung gearbeitet werden.

Bei paralleler Veraschung von Blut (0,5 ccm einer Verdünnung 1:1000) in engen (15 mm Durchmesser) und weiten (18 mm Durchmesser) Reagenzgläsern konnten wir in den weiten Gläsern bei ganz gleich ausgeführter Veraschung einen nicht unbeträchtlichen Verlust an Stickstoff feststellen; so verbrauchten wir z. B. im Kontrollglas: bei Veraschung im engen Reagenzglas 0,75 ccm Ammoniumchloridlösung, bei Veraschung im weiten Reagenzglas 0,42 ccm Ammoniumchloridlösung.

Solche parallele Veraschungen wurden bald schneller und energischer — in 4 bis 5 Minuten —, bald langsamer und vorsichtiger — in 10 bis 12 Minuten — ausgeführt. Die erwähnten Unterschiede waren bald kleiner, bald größer, blieben aber in allen Fällen beträchtlich. Auch bei Veraschung von Harnstofflösungen bekannter Konzentration in engen Röhren fanden wir einen Verlust, der bis zu 5 Proz. stieg.

Es kam daher der Gedanke, diesem Übelstande durch Reduzierung der Reagenzrohröffnung abzuhelfen; es wurde zu diesem Zwecke in genannte Öffnung nach Verdampfung des Wassers ein kurzes Reagenzrohr von kleinerem Durchmesser hineingelegt. Gleich bei den ersten Versuchen zeigte sich, daß dadurch dem Ausströmen des stickstoffhaltigen Schwefelsäureanhydrids wirklich Einhalt getan wird. Hier wirkt offenbar nicht nur die Verengerung der Reagenzrohröffnung, sondern auch die Vergrößerung der Kondensationsoberfläche, Wirbel- und Kühlerwirkung des hineingelegten Verengerungsrohres. Nach zahlreichen Versuchen kamen wir zu folgender, unseres Erachtens zweckmäßigsten Form und Größe der Verengerungsröhren: Länge etwa 6 bis 6,5 cm, Durchmesser im Verhältnis 1 : 1,2 bis 1,3 zu dem inneren Durchmesser der Veraschungsröhren; unten sollen sie nicht rund, sondern spitz endigen, wobei die Spitze so nach einer Seite gebogen ist, daß sie die Innenfläche des Veraschungsrohres berührt. Dadurch wird ein besserer Abfluß der sich auf dem Verengerungsrohr kondensierenden Dämpfe (enthalten bei der Veraschung anfänglich noch Stickstoff) ermöglicht. Der obere Rand des Verengerungsrohres wird in drei symmetrisch gelegenen Punkten scharf nach außen gebogen, und zwar so, daß eine Spitze sich auf der Seite befindet, welche der unteren Spitze gegenüberliegt; bei solcher Lage der Spitzen kann man mit dem Zeigefinger der Hand, in welcher das Veraschungsrohr gehalten wird, durch Druck auf den Rand des Verengerungsrohres die untere Spitze dank der Hebelwirkung heben und senken; damit wird der Abfluß der sich kondensierenden Dämpfe bedeutend erleichtert.

Das Verengerungsrohr wird im Reagenzrohr bis zur Hinzufügung des Wassers belassen; hier wird es mit den ersten Anteilen der 10 ccm Wasser abgespült und entfernt. Ein jedes Reagenzglas hat somit sein eigenes Verengerungsrohr. Die Kontrollröhre kann ohne Verengerungsrohr auf der Flamme erhitzt werden.

Beim Gebrauch der Verengerungsröhren stellte sich jedoch bald ein Übelstand heraus: die Veraschungszeit verschiedener Proben ein und desselben Blutes auf der gleichen Flamme war sehr verschieden und schwankte z. B. zwischen 5 und 13 Minuten. Wir fanden nun, daß dies von der Menge des sich auf den Wänden der Reagenzgläser kondensierenden Wassers abhängt: je mehr Wasser auf den Wänden, desto länger die Veraschungszeit. Die Erklärung ist natürlich sehr einfach: die Verdünnung der Schwefelsäure mit Wasser erniedrigt deren Siedetemperatur, was eine Verlängerung der Veraschungsdauer zur Folge hat.

Wir gingen daher dazu über, die Wände der Reagenzgläser nach Verdampfen des Wassers von letzterem durch Erhitzen über der Mikroflamme zu befreien. Diese Trocknung der Reagenzglaswände nimmt höchstens 1 Minute in Anspruch, dafür wird aber die Veraschungszeit beträchtlich abgekürzt und mehr oder weniger konstant; die Veraschung des Blutreststickstoffs erfordert z. B. 1,5 bis 2 Minuten.

Weiter fanden wir in Versuchen mit Harnstofflösungen bekannter Konzentration, daß es nicht einerlei ist, in welchem Moment die Trocknung der Reagenzglaswände vorgenommen wird. Tut man dies erst nach Verdampfung des ganzen Wassers, so entsteht leicht ein Verlust an Stickstoff. Wir kamen in dieser Beziehung zu folgenden Arbeitsregeln: zuerst wird das Wasser ziemlich energisch bei noch kalten Wänden des Reagenzglases verdampft. Dadurch wird eine Herabschwemmung der an den Wänden haftenden stickstoffhaltigen Flüssigkeit erzielt. Die Wände werden über der Flamme getrocknet, wenn im Veraschungsrohr sich noch etwa 0,1 bis 0,2 ccm Wasser befindet. Der Rest des Wassers wird nun bei heißen und trockenen Wänden des Reagenzglases verdampft. Hiernach wird das Verengerungsrohr eingelegt und die stickstoffhaltige Substanz verascht.

Die Veraschung geht dabei so ruhig vonstatten, daß sogar der Gedanke aufstieg, ob man bei Trocknung der Reagenzrohrwände nicht auch ohne Verengerungsrohre auskommen könnte. Daraufhin gestellte Versuche zeigten jedoch, daß dies nicht der Fall ist; ohne Verengerungsrohr wurden z. B. in der Kontrollröhre 0,55 ccm, mit Verengerungsrohr dagegen 0,85 ccm Ammoniumchloridlösung verbraucht.

Mandel und *Steudel* geben in ihrem sehr lesenswerten Büchlein „Minimetrische Methoden der Blutuntersuchung" den Rat, bis zur vollkommenen Farblosigkeit zu erhitzen, „*aber ja nicht länger*"! Es ist jedoch klar, daß dieser Moment sehr schwer genau zu fassen ist.

Wir versuchten daher wiederholt zu einem brauchbaren Resultat auch bei etwas zu langer Erhitzungszeit zu kommen, doch vergebens: in einem großen Prozentsatz aller Proben wurde ein Verlust an Stickstoff (bis zu 10 Proz.) festgestellt. Anders gestaltete sich jedoch das Bild, als wir dem Gebrauch von Verengerungsröhren das Trocknen der Reagenzglaswände hinzufügten. Folgende Tabelle möge dies illustrieren.

Substanzmenge ccm	Veraschung in Minuten: bis zur Farblosigkeit	Veraschung in Minuten: darüber hinaus	Menge der verbrauchten NH_4Cl-Lösung ccm
I. a) 0,5 (Blut)	3	0	0,66
b) 0,5 „	3	3	0,67
II. a) 0,5 „	3,5	0	0,66
b) 0,5 „	3,5	3	0,67
III. a) 0,5 „	4	0	0,67
b) 0,5 „	3	4	0,67
I. a) 0,5 (Harnstoff) . .	2	0	0,55
b) 0,5 „ . .	1,5	3,5	0,54
II. a) 0,5 „ . .	1,5	0	0,55
b) 0,5 „ . .	1,5	3,5	0,55

Wie aus der Tabelle ersichtlich, erhält man bei Einhaltung der oben angegebenen Arbeitsweise auch bei einer etwas zu langen Erhitzungszeit keine Verluste an Stickstoff; das gibt die Möglichkeit, die Veraschung bis zum Moment fortzusetzen, wo wir sicher sein können, daß wirklich aller Stickstoff verascht ist.

Auch die besten Jenaer Reagenzgläser („aus Verbrennungsröhrenglas") werden schließlich beim Gebrauch am unteren Ende spröde und bersten daselbst. Wir untersuchten daher, ob man solche Gläser nicht noch in Gebrauch nehmen könnte, wenn man sie bis zu einer Länge von 15 cm verkürzen würde. Es wurde daher vergleichsweise Blut (wie immer 0,5 ccm einer Verdünnung 1 : 1000) in Reagenzgläsern von 18 und 15 cm Länge verascht. Letztere Prozedur nahm — ohne Verdampfungszeit des Wassers — in allen Fällen 3 bis 3,5 Minuten in Anspruch; verascht wurde mit Verengerungsröhren.

Die Resultate waren folgende:

Länge des Reagenzglases cm	NH_4Cl-Verbrauch im Kontrollrohr: I. Paar ccm	II. Paar ccm	III. Paar ccm	Mittel ccm
18	0,85	0,86	0,84	0,85
15	0,85	0,85	0,85	0,85

Man kann also bei Einhaltung der angegebenen Arbeitsweise ganz gute Resultate, auch mit Reagenzröhren von 15 cm Länge erhalten, was praktisch wohl in vielen Fällen ins Gewicht fallen könnte.

Schließlich möchten wir noch empfehlen, den Gebrauch der Mikrobürette durch Benutzung des sehr handlichen Kolorimeters von *Königsberger-Autenrieth* zu umgehen; die Methode kann unseres Erachtens dadurch in bezug auf Einfachheit der Ausführung und Genauigkeit der Bestimmungen nur gewinnen. Dieser Gedanke ist natürlich nicht mehr neu und schon von mancher Seite mit gutem Erfolg verwirklicht worden; wir erwähnen ihn hier nur der Vollständigkeit halber.

Zusammenfassung.

1. Es wird empfohlen, die Seignettesalzlösung nicht mit Nesslerreagenz, sondern mit Sublimat zu konservieren. Bei Stickstoffbestimmungen in Blut und Harn ist die Seignettesalzlösung für gewöhnlich entbehrlich.

2. Das aus metallenen Destillationsapparaten gewonnene Wasser ist einer nochmaligen Destillation (am besten wohl mit Kaliumpermanganat) im *Glaskolben* zu unterwerfen.

3. Es wird als zweckmäßiger gefunden, statt 0,3 ccm der Natriumhydroxydlösung nur 0,25 ccm derselben in den Versuch zu nehmen und die Schwefelsäure halb mit destilliertem Wasser zu verdünnen (in den Versuch wird dann 0,1 ccm genommen).

4. Die Ammoniumsalzlösung muß zur Kontrollröhre in annähernd zureichender Menge gleich nach Erhitzung der Schwefelsäure gegeben werden; die endgültige Austitrierung erfolgt nach Zusatz des Nesslerreagens. In diesem Moment soll der Unterschied in der Farbenintensität zwischen Kontroll- und Versuchsrohr nicht mehr als 30 Proz. betragen.

5. In die Öffnung der Reagenzröhren (Durchmesser 17 bis 20 mm) ist bei der Veraschung ein Verengerungsrohr bestimmter Form und Größe hineinzulegen.

6. Vor dem Hineinlegen genannter Verengerungsröhren sind die Wände der Veraschungsröhren durch Erwärmen über der Mikroflamme von den kondensierten Wasserdämpfen zu befreien.

7. Bei Befolgung der angegebenen Arbeitsweise ist eine Verlängerung der Verbrennungszeit über das notwendige Maß im Betrage von 2 bis 3 Minuten ohne merkbaren Einfluß auf die Genauigkeit der Bestimmungen.

8. Genannte Arbeitsweise ermöglicht genaue (Fehler $\pm$ 2 bis 3 Proz.) Bestimmungen auch in Reagenzgläsern von 15 cm Länge.

Literatur.

1.) *D. Acél*, diese Zeitschr. **121**, 120, 1921. — 2) *P. Fleury* und *H. Levaltier*, Ber. über die ges. exper. Physiol. u. Pharm. **25**, 412, 1924. — 3) *S. W. Winkler*, Chem.-Ztg. 1899, S. 454; 1900, S. 586 (nach *A. Komarowsky* zitiert). — 4) *W. Treadwell*, Lehrb. d. analyt. Chem. **1**, 62, 1920. — 5) *J. A. Mandel* und *H. Steudel*, Minimetrische Methoden der Blutuntersuchung 1924, S. 13. — 6) *W. Treadwell*, Lehrbuch **2**, 54, 1921.

Über die Methodik der quantitativen Bestimmung der Eiweißkörpergruppen des menschlichen Blutserums. I.

Von

W. Starlinger und K. Hartl.

(Aus der II. medizinischen Universitätsklinik in Wien.)

(Eingegangen am 29. April 1925.)

I. Begriffsbestimmung.

Da einerseits ein Einblick in den physikalisch-chemischen Zustand der Serumeiweißkörper, der in letzter Zeit immer größere Beachtung für eine Reihe bedeutsamer Fragestellungen zu beanspruchen scheint, einstweilen noch am zuverlässigsten und eindruckvollsten auf Grund der Maßanalyse gewisser genauer definierbarer Eiweißgruppen gewonnen werden kann, andererseits aber die zu solchen Zwecken angewandte Methodik vielfach ohne genügende Sicherstellung ihrer theoretischen Grundlagen zur Verwendung gelangt, war zu eigener Aufklärung erforderlich, eine allgemeine kritische Prüfung der bereits bekannten Methoden durchzuführen und etwa vorhandene Möglichkeiten zur Aus- oder Neugestaltung aufzugreifen. Die Darlegung der dabei gemachten Erfahrungen scheint berechtigt: einerseits, weil eine zusammenfassende Kritik[1]) der hier zur Erörterung gelangenden Fragestellung und ihres Tatsachenmaterials nicht vorliegt, andererseits, weil die hier mitgeteilten Ergebnisse auf mehrjährigen Erfahrungen beruhen.

Vor Erörterung der technischen Methodik jedoch sollen in möglichster Kürze die Erwägungen dargelegt werden, von denen bei der Begriffsbestimmung (also Abgrenzung der einzelnen Eiweißkörpergruppen) ausgegangen wurde; da:

---

[1]) Die einzige vorliegende zusammenfassende Darstellung von *E. Schmitz* (eben im Handb. d. biologischen Arbeitsmethoden von *Abderhalden* 1924, Abt. 4, Teil 4, H. 1, Lfr. 148 erschienen) ist lediglich als beschreibende Darstellung einiger in den letzten Jahren angegebener Verfahren zu bezeichnen, bei der weder Vollständigkeit, noch zusammenfassende Kritik angestrebt wurde. Auf einige Arbeiten, die in jüngster Zeit Teilfragen behandelten, wird im Laufe der Darstellung zurückzukommen sein.

1. keine Ursache vorliegt, die klassischen Grundlagen der physikalisch-chemischen Eiweißfraktionierung mit Hilfe der Löslichkeitsbestimmung im Neutralsalzmedium aufzugeben, solange keine Möglichkeit besteht, auf anderem Wege eine klare und zuverlässige quantitative Trennung einzelner durch gewisse gemeinsame Leitmerkmale charakterisierter Eiweißkörpergruppen durchzuführen;

2. die klassische Neutralsalzfraktionierung grundsätzlich zwei Gruppen von Eiweißkörpern unterscheidet: eine solche, die schon bei Halbsättigung mit Ammonsulfat (Am_2SO_4) und eine solche, die erst bei Ganzsättigung mit Am_2SO_4 die Lösung verläßt, und diese Abgrenzung bei Einhaltung gewisser Bedingungen durchaus scharf und beliebig reproduzierbar in Erscheinung tritt;

3. die experimentelle Erfahrung des biologischen Versuchs lehrt, daß das Wechselverhältnis dieser beiden solcherweise zur Darstellung gebrachten Eiweißkörpergruppen wichtige und klar erkennbare Gesetzmäßigkeiten aufweist, womit der anstrebbare und angestrebte Zweck völlig erreicht wird,

wurde der hier vertretene Standpunkt folgendermaßen festgelegt: als leitendes Trennungsprinzip der beiden großen im Blutserum vorhandenen Eiweißgruppen gilt die Am_2SO_4-Fällung mit Halb- und Ganzsättigung unter einheitlich zu beobachtenden Bedingungen, auf die noch zurückzukommen sein wird; ein Ersatz des Am_2SO_4 durch andere Fällungsmittel darf nur bei Nachweis sicherer Effektübereinstimmung erfolgen; an Stelle der im Streit der Meinungen stehenden Bezeichnungen „Globuline“ und „Albumine“ treten die nichts präjudizierenden Ausdrücke: Am_2SO_4-Halb- und Am_2SO_4-Ganzsättigungsfraktion (AHF, AGF); der Unterschied gleichwertiger Methodik darf sich nur auf die methodische Technik beziehen bzw. eine Gegenüberstellung kann erst nach Ausgleich der als Grundlage dienenden Trennungs- und Begriffsbestimmung erfolgen, eine Forderung, die, so folgerichtig und selbstverständlich sie auch erscheint, doch vielfach keine Berücksichtigung gefunden hat.

II. Die allgemeinen Grundlagen der bereits vorhandenen und möglichen neuen Methodik.

Zur quantitativen Ermittlung von Eiweißkörpern stehen fünf prinzipiell verschiedene technisch-methodische Möglichkeiten offen:

1. die unmittelbare gravimetrische Bestimmung;

2. die Berechnung auf Grund des kjeldahlometrisch bestimmten N-Gehalts;

3. die Berechnung auf Grund gesetzmäßiger quantitativ-chemischer Bindung zwischen Eiweißkörpern und gewissen Fällungsmitteln;

4. die Berechnung auf Grund der Bestimmung gewisser optischer Eigenschaften, und zwar

a) der Brechung (Refraktometrie und Interferometrie);

b) der Drehung (Polarimetrie);

c) der Beugung (Nephelometrie);

d) der Trübung (Diaphanometrie);

e) der Färbung (Kolorimetrie);

5. die empirische Berechnung auf Grund der Bestimmung gesetzmäßig interferierender physikalischer Eigenschaften, und zwar der inneren Reibung und Brechung (kombinierte Viskosi-Refraktometrie).

Eine zweite Unterscheidung ergibt die von der jeweils gewählten Methodik abhängige Möglichkeit, absolute oder nur relative Werte zur Bestimmung zu bringen. Absolute Werte vermitteln Gravimetrie, Kjeldahlometrie, quantitativ-chemische Bindungsmessung, Refrakto-Interferometrie und Polarimetrie (letztere beide unter Voraussetzung des Bestehens einer einheitlichen und konstanten spezifischen Refraktion bzw. spezifischen Drehung), relative Werte, die also erst unter Zuhilfenahme der Eichung an Standardmethoden auf absolute Zahlen umgerechnet werden können, vermitteln Nephelometrie, Diaphanometrie, Kolorimetrie und kombinierte Viskosi-Refraktometrie.

Schließlich erscheint es notwendig, einen dritten wichtigen Unterschied in der Tatsache festzustellen, daß einige Methoden (1, 2, 3) imstande sind, sowohl alle einzelnen Teilfraktionen gesondert, als auch das Gesamteiweiß direkt quantitativ zu erfassen, und solcherweise eine ausgezeichnete innere Kontrolle ermöglichen, während andere (alle optischen Methoden 4a bis e) aus je zwei direkt bestimmten Faktoren den dritten indirekt mit Hilfe der Differenzberechnung ermitteln, eine innere Kontrolle also nicht gestatten. Ebenso läßt auch die kombinierte Refrakto- und Viskosimetrie die innere Kontrolle vermissen.

Nach diesen Erwägungen, die die allgemeinen theoretischen Grundlagen festzulegen hatten, wird im folgenden die spezielle praktische Brauchbarkeit bzw. Möglichkeit der einzelnen angeführten Methoden zu prüfen sein.

III. Die spezielle Technik und Methodik.

Es wird zu bedenken und zu prüfen sein:

1. der Grad der Genauigkeit und Zuverlässigkeit der jeweils ermittelten Resultate (Kriterium: die Mindestgröße der bei jeweiliger biologischer Fragestellung eben angestrebten und zu verwerten geplanten Ausschlagsschwankung);

2. die Größe der notwendigen Mengen des zu verarbeitenden Ausgangsmaterials (Kriterium: Mindestverbrauch im Hinblick auf

den biologischen Serienversuch; daher a priori Ablehnung von Makromethoden);

3. das Ausmaß des zeitlichen und technischen Arbeitsaufwands (Kriterium: Mindestausmaß im Hinblick auf den biologischen Serienversuch);

4. Kostspieligkeit und Seltenheit der notwendigen technischen Apparatur (Kriterium: möglichste Billigkeit und allgemeine Zugänglichkeit).

IV. Die gravimetrische Bestimmung

ist als einzige direkte Methode und daher als Grundlage der quantitativen Bestimmung der Serumeiweißkörpergruppen anzusehen; sie wird aus diesem Grunde im folgenden erstens zur Entscheidung allgemeiner methodischer Grundfragen und zweitens zur Eichung der auf anderen technisch-methodischen Grundlagen beruhenden Verfahren Verwendung finden. Vorausgeschickt möge sein, daß im folgenden aus raumtechnischen Gründen eine *tabellarische* Zusammenstellung nur erfolgt, wenn sie zum Verständnis unbedingt notwendig erscheint. Die mitgeteilten Versuchsreihen und Ergebnisse beruhen auf den Resultaten von über 700 gravimetrischen Analysen.

Das Prinzip der gravimetrischen Maßanalyse beruht auf der elektiven Fällung (durch Am_2SO_4 oder gleichwertige Neutralsalze) der gewünschten Eiweißfraktion mit nachfolgender quantitativen Abscheidung, Hitzekoagulation, Entsalzung, Entfettung, Trocknung, Wägung, Veraschung und Rückwägung derselben. Es gilt seit der Zeit der klassischen Eiweißchemie im Rahmen von Makroverfahren als solches feststehend und erlitt in verschiedenen Versuchsanordnungen mannigfache Modifikationen lediglich technisch-methodischer Natur, auf die einzugehen sich erübrigt.

Die Verwendung der gravimetrischen Maßanalyse als Makroverfahren wurde im biologischen Versuch nie bevorzugt, welche Tatsache ihre Ursachen wohl in der Nichtberücksichtigung der im vorstehenden unter Abschnitt III ausgeführten zweiten und dritten Forderung finden dürfte.

Als einziges Verfahren, das alle unter I, II, III aufgestellten Forderungen allgemeiner und spezieller Art zu berücksichtigen und zu erfüllen sucht, kann daher erst das jüngst von *Knipping* und *Kowitz*[1]) mitgeteilte angesehen werden: 1,0 ccm Serum wird mit 9,0 ccm H_2O und 10,0 ccm kaltgesättigter Am_2SO_4-Lösung versetzt, durch ein vorher bei Gewichtskonstanz gewogenes Schleicher-Schüllfilter geschickt und sechsmal mit halbgesättigter Am_2SO_4-Lösung nachgewaschen; darauf wird das Filter zerschnitten, mit 10,0 ccm H_2O und 2,0 ccm (gesättigter NaCl-Lösung + 2,5proz. Essigsäure $\overline{aa}$) gekocht, durch ein zweites gewogenes Filter geschickt, sechsmal mit H_2O,

---

[1]) *Knipping* und *Kowitz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 1924, S. 135.

einmal mit Alkohol und Äther nachgewaschen und im Wägegläschen bei 105° getrocknet und gewogen; das Filtrat wird mit 1,0 ccm 2,5proz. Essigsäure gekocht, durch ein drittes gewogenes Filter geschickt, wie oben nachgewaschen, getrocknet und gewogen. Der erstermittelte Wert gibt die Menge der Am_2SO_4HF („Globuline"), der zweitermittelte die der Am_2SO_4GF („Albumine") an, das Gesamteiweiß wird durch Summation berechnet.

Die Kritik der Methode hat anzuführen:

1. daß der Verzicht auf Veraschung und Rückwägung nur statthaft ist, wenn die Entfernung des anwesenden Fällungssalzes so weitgehend durchgeführt wird, daß der dadurch hervorgerufene Wägungsfehler vernachlässigt werden kann. Da dieser Nachweis nicht erbracht ist, eigene experimentelle Prüfung (Versuchsreihe 1) aber im Gegenteil zum Ergebnis führte, daß das Filtrat der sechsten Wasserwaschung fast ausnahmslos mit $BaCl_2$ starken Niederschlag gibt, somit noch reichlich Am_2SO_4 enthält, muß diese zeit- und arbeitstechnisch wichtigste Vereinfachung des klassischen Verfahrens *im Rahmen der Methode von Knipping und Kowitz* zurückgewiesen werden;

2. daß das durch die großen anwesenden Am_2SO_4-Mengen notwendige lange Nachspülen mit Wasser in den meisten Analysen zu Eiweißverlusten führt, die erst bei innerer Kontrolle durch Vergleich des durch Summation der gewonnenen AHF und AGF berechneten Gesamteiweißwertes mit dem direkt bestimmten aufgedeckt werden (Versuchsreihe 2);

3. daß sich die Verwendung von 1,0 ccm Serum als technisch unzweckmäßig erweist, weil die quantitative Auswaschung des Fällungssalzes und Zurückhaltung des Eiweißes um so schwieriger gelingt, je größere Eiweißmengen zur Verarbeitung gelangen, je längere Zeit also Filterung und Nachwaschen beanspruchen; daß aus diesem Grunde mithin die Verwendung kleinerer Serummengen nicht nur in Rücksicht auf den Arbeitsaufwand, sondern auch hinsichtlich der Zuverläßlichkeit des Analysenergebnisses vorzuziehen ist (Versuchsreihe 3);

4. daß die 10fache Wasserverdünnung des Serums, die eine unverhältnismäßige absolute Vermehrung der zugesetzten Am_2SO_4-Menge nach sich zieht, einerseits als zur Erzielung einer elektiven Eiweißgruppenfällung überflüssig, andererseits auf Grund der unter 3. angeführten Tatsachen auch als unzweckmäßig bezeichnet werden muß.

Daß die starke Wasserverdünnung des Serums in Rücksicht auf die erstrebte quantitativ-elektive Eiweißfällung nicht erforderlich ist, geht daraus hervor, daß bei genauer gravimetrischer Vergleichsbestimmung der AHF und AGF in verschieden stark wasserverdünnten Seren in vielen Analysen überhaupt keine Beziehungen zur Wasserverdünnung (also gleiche Werte sogar im unverdünnten Serum) beobachtet werden konnten, während in anderen zwar ein Abhängigkeitsverhältnis zur Feststellung kam, immer aber so, daß eine dreifache Wasser-, also sechsfache Endverdünnung völlig genügte (Versuchsreihe 4);

5. daß die Verwendung der analytischen Wage und der dadurch bedingten Wägung in Wägegläschen eine unverhältnismäßige Belastung vor allem des zeitlichen Arbeitsaufwandes bedeutet.

In Erkenntnis dieser Fehlerquellen und zeit- und arbeitstechnischen Unzweckmäßigkeiten wurde eine eigene Methodik, die im allgemeinen mit der von *Knipping* und *Kowitz* angegebenen weitgehende Übereinstimmung aufweist, folgendermaßen ausgestaltet:

Vorbereitung: Es werden für jede Bestimmung drei Filter (5 ccm DM) (und zwar nur Schleicher-Schüll-589-Blauband, da nur diese genügende Härte zur Erreichung quantitativer Filterung feinstkörniger Eiweißfällung besitzen) derart vorbereitet, daß eines am Rande genügend ausgiebig beschnitten wird, um zusammen mit dem zweiten nicht über 450 mg zu wiegen (denn, da ein unbeschnittenes Filter etwa 250 mg Gewicht besitzt, würden zwei den Wägebereich der Torsionswage von 500 mg überschreiten). Die Trocknung zur Gewichtskonstanz erfolgt zusammen mit dem dritten Filter bei 105° durch 2 Stunden, die Abkühlung in geschlossener Petrischale im Exsikkator. Da die Wägung jedes Filters auf der Torsionswage in wenigen Sekunden durchzuführen ist, empfiehlt sich die Trocknung von je zwei Filtergarnituren = sechs Filter = vier Wägungen (zweimal ein unbeschnittenes, zweimal ein beschnittenes + unbeschnittenes ineinandergesteckt) in einer Petrischale. Die Wägung auf der Torsionswage kann und muß so rasch erfolgen, daß die Luftfeuchtigkeit, die nach 1 Minute bereits einen Wägefehler von etwa 1 bis 2 mg nach sich zieht, keinen Einfluß auszuüben in der Lage ist.

Ausführung: 0,5 ccm Serum werden mit 1,0 ccm Wasser und 1,5 ccm gesättigter Am_2SO_4-Lösung (426 g reinstes kristallisiertes Am_2SO_4 + 574 ccm destillierten Wassers) versetzt, nach 2 (oder mehr) Stunden durch das beschnittene Filter geschickt und mit halbgesättigter Am_2SO_4-Lösung so lange nachgewaschen, bis das Filtrat keine Eiweißreaktion mehr gibt (was nach etwa 15,0 ccm halbgesättigter Am_2SO_4-Lösung erreicht ist); darauf wird das Filter als ganzes in einer gut gereinigten, frischen Eprouvette mit Hilfe eines Glasstabes in etwa 5,0 ccm n/50 Essigsäure möglichst zerfasert und ausgelaugt, im Wasserbad gekocht, nach kompletter Eiweißfällung durch das zweite unbeschnittene (und mitgewogene) Filter geschickt, mit Wasser bis zur negativen $BaSO_4$-Reaktion (die dazu nötige Wassermenge wechselt von Analyse zu Analyse und kann daher nicht festgelegt sein), dann je einmal mit Alkohol und Äther nachgewaschen und wie oben getrocknet und gewogen; das gesamte Filtrat wird im kochenden Wasserbad mit 2proz. Essigsäure bis zur grobflockenden Trübung versetzt, durch das dritte Filter geschickt und gleicherweise wie oben weiter behandelt. Im Filter 1 + 2 gelangt das Serumeiweiß der AHF, in Filter 3 das der AGF zur Bestimmung. Zur Bestimmung des Gesamteiweißes (und damit ermöglichten inneren Kontrolle) werden mindestens 0,25 ccm Serum mit einigen Kubikzentimetern n/50 Essigsäure und einigen Tropfen halbgesättigter Am_2SO_4-Lösung versetzt und wie oben die Teilfraktionen weiterbehandelt (in diesem Falle natürlich unter Erforderung eines vierten Filters).

Die Kritik der Methode hat anzuführen:

1. Der Verzicht auf Veraschung und Rückwägung ist erlaubt, da das Nachwaschen bis zum Verschwinden der $BaSO_4$-Reaktion fort-

gesetzt und die noch zurückgebliebenen Salzreste außer bei besonderer Fragestellung (siehe 5.) vernachlässigt werden dürfen:

Versuchsreihe 5. Die in zehn Kontrollanalysen nach Veraschung bei Rückwägung bestimmten Aschenmengen schwankten um 0,0003 g.

2. Das Gewicht des in der Kritik der Methodik von *Knipping* und *Kowitz* unter 2. angeführten Einwandes des oftmaligen Vorkommens von Eiweißverlusten auf Grund des notwendigen langen Wasserspülens erfährt zwar eine Abschwächung, da infolge der Verarbeitung geringerer absoluter Eiweiß- und Salzmengen eine bedeutende Verkürzung der Waschungszeit erreicht wird, ist aber immer noch so bedeutsam, daß die innere Kontrolle, d. h. die selbständige Bestimmung des Gesamteinweißgehalts als unbedingte Notwendigkeit anzusehen ist:

Versuchsreihe 6. Die zur Feststellung gelangten Differenzen zwischen errechnetem und gefundenem Gesamteiweißgehalt betrugen fast niemals weniger als 0,30 g-Proz. und erreichten (in seltensten Fällen) ein Ausmaß bis 1,5 g-Proz., was einem möglichen Eiweißverlust bis 21 Proz. (den durchschnittlichen Gesamteiweißgehalt zu 7,0 g-Proz. veranschlagt) entspricht. Die Differenz von Kontrollanalysen betrug in den Fällen geringer Eiweißverluste meist um 0,20 g-Proz. der einzelnen Teilfraktionen, erreichte jedoch in Fällen großer Eiweißverluste Werte bis 1,00 g-Proz.

3. Die *Knipping* und *Kowitz* gegenüber unter 3. und 4. geltend gemachten Forderungen können als erfüllt gelten.

4. Die Einführung der Torsionswage (und der damit mögliche Verzicht auf das Wägegläschen) bedingen eine große Verminderung des zeitlichen Arbeitsaufwandes. Die Einführung der Torsionswage ist hinsichtlich der Genauigkeit der Wägung (außer bei besonderer Fragestellung) erlaubt:

Die Genauigkeit derselben beträgt bei sorgfältiger Wägung $\pm$ 0,000 25 g, so daß die technisch-methodische Grundlage bei Verarbeitung von 0,5 ccm Serum, die unter Veranschlagung eines durchschnittlichen Gesamteiweißgehalts von 7,0 g-Proz. 0,035 g Eiweiß, bzw. unter Annahme eines durchschnittlichen Verhältnisses AHF : AFG = 1 : 1 je 0,0175 g AHF und AGF enthalten, eine theoretische Fehlerquelle von $\pm$ 1,5 Proz. Eiweiß beinhaltet, im angegebenen Beispiele also 5 Einheiten der zweiten Dezimale nicht erreicht.

5. Da für biologische Fragestellungen eine Genauigkeit des Resultats, ausgedrückt in Gramm-Prozenten der gefundenen AHF und AGF, von $\pm$ 0,30 g-Proz. als hinreichend zu bezeichnen ist, da die zu beobachtenden biologischen Schwankungen mehr als das 10fache betragen können, fallen mithin Rechenfehler und Wägefehler weit unter diese Grenze. Doch selbst bei Notwendigkeit größerer Genauigkeit im Rahmen besonderer Fragestellung bleibt der technisch methodisch bedingte (Wäge-) Fehler hinter dem Fehler der technischen Durchführung, der auch bei Anwendung von Makroverfahren und subtilster Technik (Veraschung) immer noch den Wägefehler bedeutend

überschreitet, weit zurück, so daß der Gebrauch einer feineren Wage nur scheinbar genauere Resultate liefert.

Da sich nun infolge des unter 2. angeführten, nicht ausschaltbaren Eiweißverlustes, der jeweils durch die innere Kontrolle der Bestimmung des Gesamteiweißgehalts aufgedeckt wird, vielfach die Notwendigkeit ergibt, die bei Analyse der AHF und AGF gewonnenen Werte zu verwerfen, kann die Verwendung des Verfahrens als Standardmethodik nicht in Frage kommen.

Die Umgestaltung mußte also vor allem als Aufgabe betrachten, die oben ausgeführte Hauptfehlerquelle, den Eiweißverlust, auszuschalten, der durch die Notwendigkeit der langen Wasserspülung, die ihrerseits ihre Ursache in der großen Menge des zugesetzten Fällungssalzes findet, bedingt wird. Dies gelingt im Rahmen folgender Methodik:

0,5 ccm Serum werden mit 1,0 ccm Wasser und 1,5 ccm gesättigter Am_2SO_4-Lösung versetzt und nach 2 (oder mehr) Stunden bis zur völligen Klärung der überstehenden Flüssigkeit, die die AGF enthält, zentrifugiert [etwa 30 Minuten[1])]. Von dieser werden mindestens 2,0 ccm (möglichst aber mehr) abpipettiert, mit der gleichen Menge n/25 Essigsäure versetzt, gekocht, durch ein vorgewogenes Filter (von gleicher Qualität wie im vorstehenden angegeben) geschickt, mit Wasser bis zur negativen $BaSO_4$-Reaktion nachgewaschen, je einmal mit Alkohol und Äther gespült, getrocknet und gewogen. Das ermittelte Eiweißgewicht ergibt unter Multiplikation mit 300 ($= 1,5 \times 2 \times 100$) bzw. einem analog berechneten Faktor) die Konzentration der AGF im Serum in Gramm-Prozenten. Der Gesamteiweißgehalt wird wie früher bestimmt, die Größe der AHF aus der Differenz berechnet.

Die Kritik der Methodik stellt fest, daß eine Reduktion der zugesetzten Salzmenge auf etwa $^1/_{10}$ dadurch erreicht wurde, daß die im Rahmen des alten Verfahrens zur Entfernung aller AGF-Reste notwendige lange Spülung des ersten, die AHF enthaltenden Filters, mit halbgesättigter Am_2SO_4-Lösung infolge des Verzichts auf direkte Bestimmung der AHF und, da die Porenflüssigkeit des Sediments gleiche Beschaffenheit besitzt wie die überstehende Flüssigkeit, entfallen kann. Die Wasserspülung wird dadurch ungefähr auf die gleiche Zeit, die bei der Bestimmung des Gesamteiweißes zur Entfernung der geringen Menge Am_2SO_4 erforderlich ist, verkürzt und der Eiweißverlust ausgeschaltet oder wenigstens auf ein Minimum beschränkt, wie aus der Übereinstimmung von Parallelanalysen der AGF hervorgeht, deren Differenz meist unter 0,0005 g bleibt und nur in seltensten Ausnahmen 0,001 g erreicht oder überschreitet (Versuchsreihe 7).

---

[1]) An Stelle des Zentrifugierens, das hier verständlicherweise möglich ist und aus Gründen der Filtersparung eingeführt wurde, kann natürlich ebensogut gefiltert werden, zur Weiterverarbeitung gelangt aber nur mehr das Filtrat.

Stehen 1,5 ccm Serum zur Verfügung, so ist es zweckmäßig, die Bestimmung des Gesamteiweißgehalts unter Verbrauch von 0,5 ccm, die Bestimmung der AGF unter Verbrauch von 1,0 ccm Serum durchzuführen, eine Modifikation, die einerseits den Fehler der methodischen Durchführung (siehe Kritik der Methodik von *Knipping* und *Kowitz* unter 3.) nicht vergrößert, weil die geringe Vermehrung der zugesetzten Salzmenge gegenüber der durch das Fortfallen des Nachwaschens der AHF bedingten großen Verminderung nicht in Betracht kommt, andererseits aber den Multiplikationsfehler erheblich verkleinert. Die Methodik gestaltet sich in diesem Falle folgendermaßen:

0,5 ccm Serum werden zur Bestimmung des Gesamteiweißgehalts wie früher verarbeitet. 1,0 ccm Serum wird mit 2,0 ccm Wasser und 3,0 ccm gesättigter Am_2SO_4-Lösung versetzt und wie oben weiterbehandelt; vom Zentrifugate werden mindestens 4,0 ccm zur Bestimmung der AGF verwendet, der Multiplikationsfaktor beträgt demzufolge höchstens: $(1{,}5 \times 100 =)$ 150.

Die Kritik ergibt, daß die Differenz von Parallelanalysen sowohl des Gesamteiweißgehalts als auch der AGF wie früher in der Regel unter 0,001 g (entsprechend 0,15 g-Proz.) bleibt und nur in Ausnahmefällen einen höheren Betrag erreicht.

Der mittlere Unterschied zwischen Parallelbestimmungen betrug dementsprechend für den Gesamteiweißgehalt im Rahmen *einer* Serie von 33 Doppelanalysen im Mittel 0,23 g-Proz. (Versuchsreihe 8), für die AGF im Rahmen *einer* Serie von 27 Doppelanalysen im Mittel 0,24 g-Proz. (Versuchsreihe 9).

Die mittlere $\pm$-Abweichung *einer* Bestimmung kann daher für den Gesamteiweißgehalt mit etwa $\pm$ 0,12 g-Proz., für die AGF ebenfalls mit etwa $\pm$ 0,12 g-Proz. und für die AHF (infolge der Differenzrechnung und dadurch bedingter doppelter Fehlermöglichkeit) mit etwa $\pm$ 0,24 g-Proz. festgesetzt werden.

Durch dieses gute Ergebnis kann der bedauerliche, jedoch nicht zu umgehende Verzicht auf innere Kontrolle nachträglich als gerechtfertigt gelten.

Nachdem die Beseitigung des Eiweißverlustes solcherweise gelungen und damit die letzte kritische Forderung erfüllt war, schien die Verwendung der gravimetrischen Methodik als Standardverfahren einerseits zur Entscheidung wichtiger Allgemeinfragen, andererseits zur Eichung der übrigen Methoden berechtigt und genügend begründet.

Um die Größenordnung der mit dieser Methode zu beobachtenden Werte des Gesamteiweißes, der AHF und AGF festzustellen, wurde die Bestimmung des ersteren in 147, die der beiden letzteren in 70 Seren durchgeführt; die Seren stammten wahllos von Versuchspersonen beiderlei Geschlechts, die mit verschiedensten (und zwar allen, häufiger vorkommenden) pathologischen Zuständen behaftet waren. Diese

Bevorzugung der pathologischen Seren entsprang der Absicht, vor allem die maximalen Ausschlagsschwankungen, mit denen gerechnet werden muß, festzulegen:

Versuchsreihe 10. Die Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes ergab in 147 Fällen *einer* Serie zwischen den Grenzwerten: 4,0 bis 9,1 g-Proz. folgende Werte:

Gesamteiweiß in g-Proz.	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
Zahl der Bestimmungen . .	6	2	6	15	35	23	34	15	9	—	2
Mittelwert in g-Proz. . . .	6,50										

Versuchsreihe 11. Die Bestimmung der AHF ergab in 70 Fällen einer Serie zwischen den Grenzwerten: 1,2 bis 6,5 g-Proz. folgende Werte:

AHF in g-Proz.	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,5
Zahl der Bestimmungen . .	3	12	11	20	7	7	5	2	1	1	1
Mittelwert in g-Proz. . . .	2,84										

Versuchsreihe 12. Die Bestimmung der AGF ergab in den gleichen Fällen zwischen den Grenzwerten: 0,5 bis 5,9 g-Proz. folgende Werte:

AGF in g-Proz.	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5
Zahl der Bestimmungen . .	1	—	4	7	4	10	13	12	12	4	3
Mittelwert in g-Proz. . . .	3,64										

Versuchsreihe 13. Die Bestimmung des Prozentverhältnisses zwischen AHF und AGF ergab in den gleichen Fällen zwischen den Grenzverhältnissen: 17 : 83 bis 89 : 11 folgende Größenordnungen der Verhältniswerte:

Größenordnung des Proz.-Verhältnisses zwischen AHF—AGF	10 : 90	20 : 80	30 : 70	40 : 60	50 : 50	60 : 40	70 : 30	80 : 20
Zahl der Bestimmungen	1	7	18	23	8	7	4	1

Auf eine Erörterung dieses Ergebnisses vom biologischen Standpunkt aus kann im Rahmen dieser Darstellung, die lediglich methodische Fragestellungen zu berücksichtigen hat, nicht eingegangen werden.

Ein Vergleich mit entsprechenden Literaturangaben konnte nicht durchgeführt werden, da gravimetrische Bestimmungen des Gesamteiweißes und seiner Untergruppen an einigermaßen genügend großem Material pathologischer Seren nicht vorliegen.

V. Der Ersatz des Am_2SO_4 durch andere Salze.

Da die erste grundsätzliche Allgemeinfrage über das Ausmaß der zur elektiven Abscheidung der AHF notwendigen Mindestwasserverdünnung des Serums bereits im vorstehenden speziell-methodischen Teil abgehandelt und im Sinne einer mindestens dreifachen Wasser-, unter Einbeziehung der Am_2SO_4-Lösung, also sechsfachen Gesamtverdünnung entschieden wurde, konnte an die Prüfung der zweiten wichtigsten Fragestellung nach der Möglichkeit des Ersatzes des Am_2SO_4 durch andere Salze gegangen werden, der namentlich im Hinblick auf Durchführung und Brauchbarkeit der kjeldahlometrischen Methodik besondere Bedeutung zukommen mußte.

Als Ersatzmittel kommen fast einzig $MgSO_4$ und Na_2SO_4 in Betracht.

1. Der gleiche Fällungseffekt von Am_2SO_4-Halb- und $MgSO_4$-Ganzsättigung gilt seit *Hammarsten*[1]) als Grundregel der klassischen Eiweißchemie und fand als solche fast allgemeine Anerkennung, wenn von einigen Angaben, daß bei $MgSO_4$-Ganzsättigung auch Teile der „Albumine" ausgefällt und so größere Mengen von „Globulinen" vorgespiegelt werden (*Heynsius*, *Marcus*, *Robertson*), abgesehen wird.

Eigene Untersuchungen über die $MgSO_4$-Fällung an sich und im Vergleich zur Am_2SO_4-Fällung ergaben folgende Befunde und Folgerungen:

Im Rahmen der methodisch-technischen Durchführung der $MgSO_4$-Fällung mußten gleiche Grundsätze hinsichtlich Serummenge und Gesamtverdünnung Geltung besitzen wie im Rahmen der Am_2SO_4-Fällung. Da weiters von vornherein auf einen Mindestverbrauch des zugesetzten Salzes, dessen absolute Mengen auf Grund des Prinzips der Ganzsättigung an sich bereits sehr groß sind, geachtet werden mußte, wurde geprüft, ob eine Verminderung der Salzsättigung auf Werte $< 1/1$ (= 100 Vol.-Proz. Sättigung mit gesättigter Lösung) statthaft wäre.

Versuchsreihe 14. Aus 0,5 ccm Serum wurden bei Zusatz fallender Mengen gesättigter $MgSO_4$-Lösung von 24,5 ccm bis 4,5 ccm entsprechend solcherweise erzielter Salzkonzentration von 98 bis 90 vol.-proz. Sättigung mit gesättigter $MgSO_4$-Lösung meistens bis zur 90 vol.-proz. Sättigung, immer aber bis zur 96 vol.-proz. Sättigung (= 0,5 ccm Serum + 11,5 ccm gesättigter $MgSO_4$-Lösung) gleiche Eiweißmengen zur Ausscheidung gebracht.

Daraus ergab sich die Überflüssigkeit des $MgSO_4$-Zusatzes in pulverisierter Form im Überschuß und völliges Genügen der Verwendung gesättigter Lösung.

Da also einerseits eine 96 vol.-proz. Sättigung mit gesättigter $MgSO_4$-Lösung hinsichtlich ihres Fällungseffekts als sicher zureichend

[1]) *Hammarsten*, Pflügers Arch. 1878, S. 17.

anzusehen war, andererseits die dabei bewirkte Gesamtverdünnung sicher genügen mußte, da sie das doppelte Ausmaß erreichte wie im Rahmen der Am_2SO_4-Fällung, wurde die gravimetrische Methodik auf Grundlage der $MgSO_4$-Fraktionierung folgendermaßen festgelegt:

Methode mit innerer Kontrolle. 0,5 ccm Serum werden mit 11,5 ccm gesättigter $MgSO_4$-Lösung (510 g $MgSO_4$ + 490,0 ccm H_2O) versetzt und nach einigen Stunden durch Filter I geschickt, der Rückstand mit gesättigter $MgSO_4$-Lösung bis zum Verschwinden der Eiweißreaktion nachgewaschen, samt Filter koaguliert, durch Filter II geschickt und wie beschrieben weiter behandelt. Ebenso das Filtrat unter Zuhilfenahme von Filter III.

Die Kritik der Methodik hat vor allem anzuführen, daß der schon bei Verwendung von Am_2SO_4 vielfach vorkommende Eiweißverlust in Anbetracht der hier anwesenden, um vieles größeren Salzmengen immer und in noch größerem Außmaß in Erscheinung tritt, weiter, daß die Filterung des $MgSO_4$-Niederschlags an sich große Schwierigkeiten in dem Sinne bereitet, daß, wie vielfach beobachtet wurde, nach Durchlauf einiger Kubikzentimeter klaren Filtrats plötzlich und ohne faßbare Ursache das Filter zunehmend undicht wurde. Als Ursache dürfte ein durch die große Langsamkeit der Filterung bedingtes teilweises Auskristallisieren des Salzes mit konsekutiver mechanischer Sprengung der Filterporen in Frage kommen.

Um wenigstens einigermaßen eine Einschränkung der anwesenden Salzmenge durchzuführen, wurde in Anlehnung an die oben beschriebene Am_2SO_4-Methode auf die innere Kontrolle verzichtet und nur die Eiweißmenge des Filtrats ($MgSO_4$-Ganzsättigungsfraktion MgGF) zur Bestimmung gebracht:

0,5 ccm Serum werden mit 11,5 ccm gesättigter $MgSO_4$-Lösung versetzt und nach einigen Stunden gefiltert, aliquote Filtratmengen (9,0 ccm) koaguliert und wie oben weiter verarbeitet. Eine Umgehung der Filterung des Salzniederschlages durch Ausschleudern in der Zentrifuge, die gerade in Rücksicht auf die oben beschriebenen Schwierigkeiten besonderen Vorteil bedeuten würde, ist nicht möglich, da die $MgSO_4$-Fällung infolge des hohen spezifischen Gewichts der 96 vol.-proz. gesättigten $MgSO_4$-Lösung nicht abzentrifugiert werden kann.

Unter solchen Bedingungen werden zwar, gemessen an der Übereinstimmung von Parallelbestimmungen, einwandfreie Werte für die MgGF erzielt, immer aber bedeutet die Durchführung der Eiweißfraktionierung unter Verwendung von $MgSO_4$, abgesehen von der noch offenen Frage nach der Übereinstimmung von MgGF und AHF, einen um vieles größeren Aufwand von Arbeit und Zeit als unter Verwendung von Am_2SO_4.

Der Vergleich der Serumeiweißfraktionierung mit Hilfe von Am_2SO_4 und $MgSO_4$ ergab unter Einhaltung der im vorstehenden beschriebenen Methodik bei zwölf Parallelbestimmungen (Versuchsreihe 15) in keinem

Falle genügende Übereinstimmung, dagegen Differenzen bis 50 Proz., in Anbetracht welcher Resultate auf die Fortführung der Reihe verzichtet wurde.

Aus diesem Ergebnis ist der Schluß erlaubt, daß der gleiche Fällungseffekt von Am_2SO_4-Halb- und $MgSO_4$-Ganzsättigung, der auf Grund fast ausschließlich annormalem Tierblut ausgeführter Vergleichsanalysen postuliert und in der Folge weiter übernommen wurde, zum mindesten für pathologische Menschenseren keine Geltung besitzt, ein Ersatz der Am_2SO_4-Fällung durch die $MgSO_4$-Fällung somit nicht statthaft erscheint.

2. Der gleiche Fällungseffekt von halbgesättigter Na_2SO_4-Lösung bei 37° [*Porges-Spiro*[1]), *Hopkins-Pinkus*[2])] und halbgesättigter Am_2SO_4-Lösung wurde in jüngster Zeit von *Howe*[3]) geprüft, bestätigt und als Grundlage einer kjeldahlometrischen Methode (siehe später) verwendet. Eigene Untersuchungen über die Na_2SO_4-Fällung an sich und im Vergleich zur Am_2SO_4-Fällung ergaben folgende Befunde und Folgerungen:

Methodik. 0,5 ccm Serum werden mit 2,5 ccm destillierten Wassers verdünnt, auf 37° im Brutschrank erwärmt, mit 3,0 ccm gleichwarmer gesättigter Na_2SO_4-Lösung versetzt und weiter über Nacht bei 37° im Brutschrank belassen; die Weiterbehandlung erfolgt in gleicher Weise wie bei Verwendung von Am_2SO_4 und $MgSO_4$.

Zur Kritik des Verfahrens möge lediglich bemerkt werden, daß die Fällung ungleichmäßig abläuft, in großer Abhängigkeit von Temperatur und Zeitdauer der Salzeinwirkung zu stehen scheint und bei Vergleich mit der Am_2SO_4-Fällung in Hinsicht des quantitativen Effekts (Versuchsreihe 16) fast ausnahmslos um vieles geringere Eiweißmengen zur Abscheidung bringt.

Daraus ergibt sich der Schluß, daß ein Ersatz der Am_2SO_4-Fällung auch durch Na_2SO_4 nicht angezeigt erscheint.

VI. Die kjeldahlometrische Bestimmung

ist zwar theoretisch nicht als direkte Methode zu bezeichnen, da sie die Eiweißmengen nicht unmittelbar bestimmt, sondern aus dem N-Gehalt errechnet, kann aber tatsächlich in Hinblick auf die sichergestellte Einheitlichkeit und Konstanz des Umrechnungsfaktors als solche gelten und darf daher a priori die gleiche Bewertung beanspruchen wie die Gravimetrie.

Die Kritik der methodisch-technischen Leistungsfähigkeit im Rahmen des Mikroverfahrens ergibt sich (bei Verwendung der Methodik

---

[1]) *Porges-Spiro*, Hofmeisters Beitr. **3**, 1903.
[2]) *Hopkins-Pinkus*, Journ. of phys. **27**, 1901.
[3]) *Howe*, Ber. f. ges. Phys. **11**, 402, 1922.

nach *Pregl*) aus folgender Überlegung: Da 1,0 ccm vorgelegter n/70 Lauge 0,0002 g N, 0,05 ccm (als kleinste ablesbare Einheit) mithin 0,00001 g N bzw. unter Anwendung des Faktors 6,25[1]) 0,0000625 g Eiweiß entsprachen, beträgt die theoretische Fehlermöglichkeit bei Verarbeitung von 0,1 ccm Serum, also einer Eiweißmenge von ungefähr 0,007 g (bei Annahme eines mittleren Eiweißgehalts von 7 g-Proz.) $\pm$ 0,9 Proz. Die methodisch-technische Grundlage muß somit als sehr gut bezeichnet werden.

Das Prinzip der methodischen Durchführung beruht auf der getrennten N-Bestimmung des Gesamtserumeiweißes und beider Eiweißfraktionen, die mit Hilfe der Aussalzung durch Am_2SO_4 (und Abdestillation des Salz-NH_3) oder gleichwertige N-freie Salze zur Abscheidung gebracht wurden.

Als derartige Verfahren kommen in Betracht:

1. Das Verfahren nach *Cullen-van Slyke*[2])

ist als Differenzverfahren anzusehen und bestimmt a) den Gesamt-N-Gehalt des Serums (Verbrauch 2,0 ccm), b) den Rest-N (5,0 ccm Serum und 5proz. Trichloressigsäurefällung), c) den N-Gehalt des Am_2SO_4-Halbsättigungsfiltrats (2,5 ccm Serum werden mit 10,0 ccm H_2O und 12,5 ccm gesättigter Am_2SO_4-Lösung versetzt, nach 12 Stunden filtriert, 20,0 ccm des Filtrats mit 300,0 ccm 50 proz. Alkohols, 3,0 g MgO und 1,0 ccm weißen Mineralöls in einem 500-ccm-Kjeldahlkolben bis zur negativen Lackmusprobe des Destillats destilliert und der Rückstand mit 25,0 ccm H_2SO_4, 5,0 g K_2SO_4 und einem Kristall $CuSO_4$ unter späterem Zufügen von weiteren 10,0 ccm H_2SO_4 verbrannt). Daraus berechnet sich der N-Gehalt der AHF = Gesamt-N — N des Am_2SO_4-Halbsättigungsfiltrats, der N-Gehalt der AGF = N des Am_2SO_4-Halbsättigungsfiltrats — Rest-N.

Die Kritik hat vor allem anzuführen: erstens, daß in Anbetracht des großen Verbrauchs von Serum eigentlich keine Mikromethodik vorliegt (doch könnte das Verfahren zweifellos auch auf kleinere Mengen umgestaltet werden), zweitens, daß die Verwendung von Am_2SO_4 (so notwendig an sich sie wäre) Bedenken einzuflößen vermag. Doch verfügen wir einstweilen über keine eigenen experimentellen Erfahrungen.

2. Das Verfahren nach *Berger-Petschacher*[3]).

0,4 ccm Serum werden mit 1,6 ccm 0,5proz. NaCl-Lösung versetzt, mit gepulvertem $MgSO_4$ gesättigt, 3 Stunden bei 37° gehalten und gefiltert.

---

[1]) Der auch für die Umrechnung des N-Gehalts der „Globuline" auf Eiweiß unter Hintansetzung des genaueren Wertes 6,32 von uns verwendet wird.

[2]) *Cullen-van Slyke*, Journ. of biol. Chem. 1920, S. 41. Das Originalverfahren verarbeitet Oxalatplasma und bringt auch den Fibrin-N zur Bestimmung; obige Darstellung enthält das Prinzip der Methode bei Verarbeitung von Serum.

[3]) *Berger-Petschacher*, Zeitschr. f. ges. exper. Med. **36**, 1923.

Der Niederschlag wird dreimal mit gesättigter $MgSO_4$-Lösung nachgewaschen, auf dem Filter durch 30 Minuten bei 110° im Trockenschrank koaguliert, mit destilliertem Wasser zur Salzverminderung nachgewaschen und samt Filter nach *Bang* verbrannt; das Filtrat wird mit destilliertem Wasser etwas verdünnt, im Wasserbad durch 30 Minuten gekocht, unter Prüfung auf Eiweißfreiheit gefiltert, der Niederschlag wie oben nachgewaschen und verbrannt.

3. Das Verfahren nach *Gutzeit*[1]).

Je 10,0 ccm einer Serum-Wasserverdünnung 1 : 49 werden auf 30° erwärmt und einerseits mit der gleichen Menge gleichwarmer gesättigter Na_2SO_4-Lösung, andererseits mit gepulvertem Na_2SO_4 bis zur Sättigung versetzt; die Niederschläge werden nach längstens 24 Stunden im Brutschrank gefiltert, einerseits mit halb-, andererseits mit ganzgesättigter Na_2SO_4-Lösung „tüchtig“ nachgewaschen, mit warmem Wasser gelöst, bis zur negativen Sulfosalicylprobe direkt in einen Mikrokjeldahlkolben ausgewaschen und schließlich nach *Pregl* verbrannt.

4. Das Verfahren nach *Howe*[2])

ist als Differenzverfahren zu bezeichnen und bestimmt nach *Folin-Farmer-Wu* a) den Gesamt-N-Gehalt von 0,5 ccm Serum, b) den Rest-N (10,0 ccm Filtrat einer Mischung von 0,5 ccm Serum und 15,0 ccm 5proz. Trichloressigsäure), c) den N-Gehalt von 5,0 ccm Filtrat (0,5 ccm Serum werden nach Erwärmung auf 37° mit 15,0 ccm gleichwarmer 22,2proz. Na_2SO_4-Lösung versetzt und nach 3 Stunden filtriert). Daraus berechnet sich der N-Gehalt der Na_2SO_4HF = Gesamt-N — N des Halbsättigungsfiltrats, der N-Gehalt der Na_2SO_4GF = N des Halbsättigungsfiltrats — Rest-N.

Die Kritik der letzten drei Methoden hat vor allem anzuführen, daß sie auf Grundlage einerseits der $MgSO_4$-, andererseits der Na_2SO_4-Fällung beruhen, mithin ein Trennungsprinzip beibehalten, dessen Effekt dem der Am_2SO_4-Fällung, wie im vorigen nachgewiesen wurde, nicht gleichgesetzt werden kann. Es wurde daher auf eigenen experimentellen Vergleich der Ergebnisse dieser Verfahren und der Gravimetrie mit Bedacht verzichtet. Wird jedoch von diesem prinzipiellen Bedenken abgesehen — an sich könnte ja ebensogut die $MgSO_4$- oder Na_2SO_4-Fällung als Standardfraktionierung Verwendung finden, wenn man ihre schwierigere Reproduzierbarkeit nicht in Betracht zieht —, so bleibt lediglich *ein* Einwand bestehen, der jedoch keine grundsätzliche Bedeutung besitzt. Daß alle diese Methoden an Arbeits- und Zeitaufwand die so ungemein expeditive Gravimetrie um bedeutendes überragen. Hinsichtlich des Vergleichs von kjeldahlometrisch und gravimetrisch bestimmten Eiweißmengen an sich und die ausgezeichnete

---

[1]) *Gutzeit*, Zeitschr. f. ges. exper. Med. 39, 1924.

[2]) *Howe*, Das Originalverfahren bringt auch die Unterfraktionen der „Globuline“ („Euglobuline“ „Pseudoglobuline I, II“) zur Bestimmung, wovon in obiger Darstellung abgesehen wurde.

Übereinstimmung der solcherweise erhaltenen Werte kann auf unsere Mitteilung über die Maßanalyse des Fibrinogens verwiesen werden[1]).

VII. Die Bestimmung auf Grund gesetzmäßig quantitativ-chemischer Bindung zwischen Eiweißkörpern und Fällungsmitteln.

In der Literatur konnte nur ein diesbezüglicher Hinweis von *Reitstötter*[2]) gefunden werden, der sich auf eine später zu veröffentlichende Methodik von *G. Lasch* bezieht und über ihre Verwendung im Rahmen der Am_2SO_4-Fällung zur Bestimmung der AHF und AGF berichtet.

Die jeweilige Eiweißlösung wird mit 20proz. Sulfosalicylsäure im Überschuß gefällt, in einem Glaskolben auf 100,0 ccm aufgefüllt, 12 Stunden stehengelassen, filtriert und in einem aliquoten Teil des Filtrats die Sulfosalicylsäure mit carbonatfreier Lauge unter Phenolphthalein rücktitriert.

Eine eingehende Darstellung der Methodik wurde unseres Wissens später nicht veröffentlicht, aus welchem Grunde ihre Nachprüfung nicht durchgeführt werden konnte. Über die Kritik der optischen Methoden und der kombinierten Viskosi-Refraktometrie wird in folgender Mitteilung berichtet werden.

---

[1]) *W. Starlinger, K. Hartl,* III. Mitteilung in dieser Zeitschr. im Erscheinen.

[2]) *Reitstötter,* Zeitschr. f. Immunforsch. **30**, 1920.

Über die Methodik der quantitativen Bestimmung der Eiweißkörpergruppen des menschlichen Blutserums. II.

Von

W. Starlinger und K. Hartl.

(Aus der II. medizinischen Universitätsklinik in Wien.)

(Eingegangen am 29. April 1925.)

Nachdem in der vorausgehenden Mitteilung die Darstellung des Ergebnisses der experimentellen Prüfung der gravimetrischen und kjeldahlometrischen Maßanalyse der Serumeiweißkörpergruppen abgeschlossen wurde, soll im folgenden über das Ergebnis der Kritik der refraktometrischen Methodik berichtet werden.

VII. Die refraktometrische Bestimmung

beruht grundsätzlich auf der Feststellung des Refraktionsanteils, welcher auf das Gesamteiweiß, bzw. die einzelnen Eiweißkörpergruppen entfällt, und Umrechnung in Grammprozente unter der Annahme, erstens, daß die Gesamtrefraktion die Summe der Teilrefraktionen darstellt und solcherweise eine Wechseldifferenzberechnung möglich und statthaft erscheint, zweitens, daß dem Gesamteiweiß, bzw. den einzelnen Eiweißkörpergruppen eine einheitliche und konstante spezifische Refraktion zukommt.

Die Kritik der methodisch-technischen Grundlage hat anzuführen, daß die Ablesung im *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometer auf $\pm$ 0,05 Skalenteile genau erfolgt, so daß unter einstweiliger Annahme der üblichen Relation: 0,1 Skalenteile = etwa 0,02 g-Proz. Eiweiß der technisch-methodisch begründete Ablesefehler für *eine* Ablesung $\pm$ 0,01 g-Proz. Eiweiß betragen würde. Die technisch-methodische Grundlage kann daher selbst in Erwägung der Notwendigkeit mehrerer Ablesungen im Rahmen eines kombinierten Differenzverfahrens und dadurch bedingter Vervielfachung des Fehlers als sehr gut bezeichnet werden. Die Kritik der methodischen Durchführung hat vor allem die Problematik der im vorigen angeführten beiden Grundannahmen zu berücksichtigen, wie im folgenden noch eingehend zu zeigen sein wird.

Die klassische Methodik der refraktometrischen Eiweißbestimmung wurde von *Reiss*[1]) folgendermaßen festgelegt:

Zur Bestimmung gelangt lediglich die Vollrefraktion des zu untersuchenden Serums, deren Wert auf Grund angenommener (annähernder) Konstanz der Größe der Nicht-Eiweißkörperrefraktion (n_D = 0,00277) und der spezifischen Refraktion des Gesamtserumeiweißes (n_D = 0,00172) direkt in Grammprozente Eiweiß umgerechnet wird.

Die Kritik wird vor allem die Gültigkeit dieser beiden Richtungswerte zu berücksichtigen haben und wird demgemäß im Rahmen der prinzipiellen Bewertung der refraktometrischen Gesamteiweißbestimmung durchgeführt werden.

Als einziges refraktometrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Serumeiweißkörpergruppen liegt die *Methodik von Brailsford-Robertson* vor, die, ursprünglich als Makromethodik ausgearbeitet, später in ein Mikroverfahren[2]) umgeändert wurde:

Auf Grund der Refraktionsbestimmung a) des Vollserums = $n_{D\mathrm{I}}$; b) des Filtrats einer durch Mischung mit gesättigter Am_2SO_4-Lösung zu gleichen Teilen der Globuline beraubten und nachher mit destilliertem Wasser doppelt verdünnten Serumprobe = $n_{D\mathrm{II}}$; c) des Filtrats einer durch Mischung mit n/25 Essigsäure zu gleichen Teilen und nachfolgendem Aufkochen (unter bestimmten Kautelen) des Gesamteiweißes beraubten Serumprobe = $n_{D\mathrm{III}}$; d) der jeweils verwendeten gesättigten Am_2SO_4-Lösung in vierfacher Verdünnung = $n_{D\mathrm{IV}}$, n/50 Essigsäure = $n_{D\mathrm{V}}$ und destillierten Wassers = $n_{D\mathrm{VI}}$: wird rechnerisch ermittelt der Brechungswert: a) der Nichteiweißkörper = $(n_{D\mathrm{III}} - n_{D\mathrm{V}}) \times 2$; b) der Am_2SO_4-Ganzsättigungsfraktion (AGF) = $(n_{D\mathrm{II}} - n_{D\mathrm{IV}}) \times 4 - (n_{D\mathrm{III}} - n_{D\mathrm{V}}) \times 2$; c) der Am_2SO_4-Halbsättigungsfraktion (AHF) = $n_{D\mathrm{I}} - (n_{D\mathrm{II}} - n_{D\mathrm{IV}}) \times 4 - (n_{D\mathrm{III}} - n_{D\mathrm{V}}) \times 2 - n_{D\mathrm{VI}}$.

Die Umrechnung auf Grammprozente erfolgt durch Division des jeweiligen absoluten Wertes der Teilrefraktion durch die jeweilige spezifische Refraktion, die nach *Robertson* für Nichteiweiß (= 1,0 g-Proz. NaCl) n_D = 0,00160, für das Eiweiß der AGF n_D = 0,00177 und für das Eiweiß der AHF n_D = 0,00229 beträgt.

Bevor auf die eigene oben angedeutete grundsätzliche Bewertung der Methode eingegangen werden soll, möge in aller Kürze über bereits vorliegende kritische Betrachtungen berichtet und die eigene Stellungsnahme dazu begründet werden:

Reiss[3]) wandte ein, daß bei der Essigsäure-Kochfällung einerseits durch das Eiweißkoagulum Nichteiweißkörper mitgerissen würden, andererseits die Ausfällung der Eiweißkörper nur unvollständig erfolge; weiters, daß bei der Am_2SO_4-Fällung im unverdünnten Serum auch labile „Albumine" an den ausfallenden „Globulin"-Niederschlag gebunden würden; schließlich, daß die Temperaturkonstanz unberücksichtigt bleibe. *Berger* und *Pet*-

[1]) *Reiss*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 51. 1904,

[2]) *B. Robertson*, Journ. of biol. Chem. **11**, 1912; **22**, 1915.

[3]) *Reiss*, Handb. d. biol. Arbeitsmethoden von Abderhalden 1923, Liefg. 106.

schacher[1]) schlossen sich diesen Punkten an und fügten hinzu, daß die rechnerische Anwendung des Differenzverfahrens grundsätzlich der inneren Kontrolle entbehre, ferner, daß das Am_2SO_4-Präzipitatvolumen und etwaige Unterschiede in der Salzverteilung zwischen Niederschlag und Lösung keine Berücksichtigung fände. Doch konnten sie nachweisen, einerseits, daß die Porenflüssigkeit des Am_2SO_4-Niederschlages die gleiche Refraktion besäße wie die (abzentrifugierte) überstehende klare Flüssigkeit, andererseits, daß das wirkliche Präzipitatvolumen im Verhältnis zur Gesamtflüssigkeit zu gering wäre, um Fehler zu verursachen. Schließlich fanden sie die Restflüssigkeit nach der Essigsäurekochfällung der Eiweißkörper ausnahmslos eiweißfrei.

Wir möchten zu diesen Einwänden bemerken, erstens, daß im Falle tatsächlich zu Recht bestehender Bindung nichteiweißartiger Körper an das Koagulum, als welche wohl kaum die Kristalloide, sondern höchstens kolloidartige und semikolloidartige Körper der Restrefraktion in Betracht kommen, das Ausmaß der dadurch bewirkten Fehlbestimmung der Restrefraktion den Bereich der technisch-bedingten Fehlabweichung (Ablesefehler, Pipettierfehler usw.) nicht überschreiten dürfte und daher nicht beachtet zu werden braucht; zweitens, daß die Sulfosalicylprobe der Restflüssigkeit fast ausnahmslos negativ ausfällt, wobei noch festgestellt sei, daß die hier und da auftretende geringe Opaleszenz vernachlässigt werden darf, da die ihr zugrundeliegende minimale Eiweißmenge, wie aus Parallelproben mit und ohne Auftreten einer Opaleszenz hervorgeht, refraktometrisch nicht in Erscheinung tritt (offenbar nicht nur wegen ihrer minimalen Quantität, sondern auch wegen einer durch die vorausgehende Essigsäure-Kochkoagulation wahrscheinlich gemachte Dispersitätsvergröberung im Sinne subvisibler Flockung); drittens, daß eine Vermehrung der Am_2SO_4HF bei Salzfällung im unverdünnten Serum, wie aus gravimetrischen Reihenuntersuchungen (s. erste Mitteilung) hervorging, nur in seltenen Fällen und in nur geringem Ausmaße vorkommt; viertens, daß die Temperaturkonstanz von 17,5° selbstverständlich einzuhalten ist; fünftens, daß die Möglichkeit der Durchführung einer inneren Kontrolle zwar als erstrebenswert, jedoch nicht als unumgänglich notwendig bezeichnet werden darf. Was schließlich die beiden letzten Einwendungen *Bergers* und *Petschachers* anlangt, so konnten sie bereits im Rahmen der gleichen Arbeit widerlegt werden.

Diese bereits vorliegende Kritik der Methode, welche ausschließlich die äußere technisch-methodische Gestaltung berücksichtigte, konnte also stichhaltige Einwände von prinzipieller Bedeutung nicht beibringen.

Die eigene experimentelle Kritik der eingangs festgestellten beiden Grundlagen der refraktometrischen Methodik hatte folgendes Ergebnis:

VIII. Die Prüfung der wechselseitigen Einflußnahme verschiedenbrechender Stoffe in einem Lösungsgemisch ohne und bei Anwesenheit von Serumeiweiß.

Versuchsanordnung. Es wurden die wichtigsten Kristalloide der Restrefraktion (NaCl, Harnstoff, Traubenzucker) je in 0,154 molarer Konzentration entsprechend der Konzentration einer 0,9proz. NaCl-Lösung, andererseits menschliches (hämoglobinfreies, klares) Blutserum in steigenden (ein-, zwei-, drei-, vierfachen) Verdünnungen auf ihren Brechungswert

[1]) *Berger* und *Petschacher*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 36. 1923.

untersucht, wobei als Verdünnungsmittel jeweils einerseits destilliertes Wasser, andererseits die angegebenen Kristalloidlösungen in wechselnder Kombination Verwendung fanden. Verglichen wurden die im Rahmen jeder (mehrfach) geprüften Versuchsanordnung experimentell festgestellten Brechungswerte mit den aus den Werten der kombinierten Ausgangslösungen errechneten, und zwar so, daß nach Abzug des Wasserwertes (n_D = 1,333 20) nur die auf die jeweils gelösten Körper entfallende Gesamtrefraktion Berücksichtigung fand.

Der Vergleich der gefundenen und berechneten Brechungswerte (Versuchsreihe 17 bis 25) ergab als größte und mittlere Differenz im Rahmen der jeweiligen Verdünnungsreihe folgende Werte:

Versuchsreihe	Verdünnungsreihe	Gesamtrefraktion der in den Ausgangslösungen vorhandenen Körper n_D = 0,0	Größte Differenz zwischen gefundenem u. berechnetem Wert n_D = 0,000	Mittlere Differenz zwischen gefundenem u. berechnetem Wert n_D = 0,000
17	0,154 mol. NaCl-Lösung . . . . . . Dest. Wasser	0154 —	04	02
18	0,154 mol. Traubenzuckerlösung . . Dest. Wasser	0347 —	07	06
19	0,154 mol. Harnstofflösung . . . . Dest. Wasser	0131 —	04	02
20	Serum . . . . Dest. Wasser	1610—1878 —	22	12
21	0,154 mol. NaCl-Lösung . . . . . . 0,154 mol. Harnstofflösung	0154 0131	04	03
22	0,154 mol. NaCl-Lösung . . . . . . 0,154 mol. Traubenzuckerlösung . .	0154 0347	06	04
23	Serum . . . . 0,154 mol. NaCl-Lösung	1610—1878 0154	25	14
24	Serum . . . . 0,154 mol. Harnstofflösung	1610—1878 0131	30	13
25	Serum . . . . 0,154 mol. Traubenzuckerlösung . .	1610—1878 0347	29	16

Es ergab sich also: 1. daß im Rahmen einfacher Wasserverdünnung die mittlere Differenz zwischen gefundenen und berechneten Werten als absolute Größe genommen für die wichtigsten Kristalloide der Restrefraktion in den Bereich des Ablesefehlers fiel und für Serum das dreifache Ausmaß desselben erreichte, somit also in Abhängigkeit von der Größe der Gesamtrefraktion stand; 2. daß im Rahmen einfacher Wasserverdünnung die mittlere Differenz als relative Größe, bezogen auf die Gesamtrefraktion für NaCl 1,3, für Harnstoff 1,5, für Traubenzucker 1,7 und für Serum 0,9 Proz. derselben betrug; 3. daß in kombinierten Lösungsgemischen die mittlere Differenz sowohl absolut wie relativ das gleiche Ausmaß erreichte wie bei einfacher Wasserverdünnung.

Da also die im Rahmen gestaffelter Konzentrationsänderungen nachweisbaren Differenzen zwischen gefundenem und berechnetem Brechungswert in Gemischen von Serumeiweißkörpern und den wichtigsten Kristalloiden der Restrefraktion die technisch-methodisch begründete Fehlermöglichkeit nicht überschritten, war der Schluß zulässig, einerseits, daß vorgenommene Verdünnungen die Refraktion gesetzmäßig erfaßbar ändern, andererseits, daß die Gesamtrefraktion die Summe der Teilrefraktionen darstellt.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Befunden *Robertsons*, der im Rahmen der Kritik seiner Methodik bei gleicher Fragestellung und Verwendung verschiedenster Ausgangssubstrate (Serum, n/10 Säure und Lauge, NaCl, viertelgesättigter Am_2SO_4-Lösung) ebenfalls genügende Übereinstimmung feststellen konnte.

Nachdem solcherweise die Kritik der ersten grundsätzlichen Annahme mit günstigem Ergebnisse für die Bewertung der Methode abgeschlossen war, konnte an die experimentelle Prüfung der zweiten prinzipiellen Voraussetzung hinsichtlich des Bestehens einer einheitlichen und konstanten spezifischen Refraktion der Serumeiweißkörper gegangen werden.

IX. Die spezifische Refraktion der Serumeiweißkörper.

Um die Fragestellung in Hinblick auf ihre theoretische Allgemeinbedeutung und praktisch-methodische Wichtigkeit beantworten zu können, mußten zuerst folgende Teilfragen eingehende Untersuchung finden:

1. Die Größe der Restrefraktion und Fehlabweichung ihrer Bestimmung.
2. Die Größe der Gesamteiweißrefraktion und Fehlabweichung ihrer Bestimmung.
3. Die Größe der spezifischen Refraktion des Gesamteiweißes und Fehlabweichung ihrer Bestimmung.
4. Die Größe der spezifischen Refraktion der AGF und AHF und Fehlerquelle ihrer Bestimmung.

Vorausgeschickt möge sein, daß alle eigenen Untersuchungen an menschlichen Seren zur Durchführung kamen, die wahllos von verschiedensten (allen häufiger vorkommenden) pathologischen Zuständen stammten; eine Experimentalgrundlage, welche dem Zwecke, vor allem die extrem vorkommenden Änderungen festzulegen, am besten dienen mußte.

1. Die Größe der Restrefraktion und Fehlabweichungen ihrer Bestimmung.

Das Prinzip der Bestimmung beruht darauf, daß Serum und Essigsäure in geeigneter Konzentration (am besten nach *Robertson* = n/25) zu gleichen Teilen gemischt und im zugeschmolzenen Glasrohr gekocht werden, worauf nach Abzentrifugieren des Eiweißkoagulums

aus der Brechung der überstehenden (eiweißfreien) Flüssigkeit (Refraktion I), die eine wässerige Lösung von n/50 Essigsäure und der nichtkoagulablen Serumkörper in halber Konzentration darstellt, und der bekannten Brechung n/50 Essigsäure (Refraktion II) die Größe der Restrefraktion nach der Formel: RR (= Refraktion I—Refraktion II) × 2 berechnet wird.

Versuchsreihe 26. Der Vergleich der Brechungswerte der Restflüssigkeiten ergab in neun Parallelbestimmungen, deren Ganzrefraktionen 18,7 bis 19,2 Skalenteile betrugen, dreimal keine Differenz und sechsmal eine solche im Ausmaß von einmal 0,05, dreimal 0,1, zweimal 0,15 Skalenteilen; bei Umrechnung in die entsprechenden RR, deren Grenzwerte n_D = 0,002 36 bis 0,002 86 betrugen, stellten sich die Differenzen, in Einheiten des Brechungsindex ausgedrückt, auf n_D = 0,000 04, 0,000 08, 0,000 12. Es wurde demnach als mittlere Differenz zwischen zwei Parallelbestimmungen der Restrefraktion n_D = 0,000 06 beobachtet, so daß die mittlere ±-Abweichung n_D = ± 0,000 03 betrug.

Über die Größe der RR liegen in der Literatur Angaben von *Reiss*, l. c., *Rohrer*[1]), *Berger* und *Petschacher*, l. c., *Neuhausen* und *Rioch*[2]) vor:

Reiss fand die n_D der RR in einem Schröpfkopfserum = 0,002 69, im Eigenserum = 0,002 71 und in einem Pferdeserum = 0,002 71 (welche Angaben deshalb im einzelnen hier verzeichnet werden, weil sie trotz ihrer schmalen Basis als Grundlage der in vielen späteren klinischen und biologischen Arbeiten angewandten refraktometrischen Serumanalyse dienten); *Rohrer* gab als mittlere Größe der RR n_D = 0,002 06 (nach Untersuchungen an 24 Rinder- und Pferdeseren und acht Menschenseren) an; *Neuhausen* und *Rioch* verzeichnen als Richtungswert n_D = 0,002 20; die eingehendsten Untersuchungen stammen von *Berger* und *Petschacher*, welche in 57 Fällen Schwankungen von n_D = 0,001 38 bis 0,004 08 um einen Mittelwert von n_D = 0,002 36 beobachteten. *Robertson* setzte als Größe der RR willkürlich den Brechungswert einer m/6 NaCl-Lösung n_D = 0,001 60 ein.

Eigene Untersuchungen kamen an 77 Seren zur Durchführung.

Versuchsreihe 27. In 77 Bestimmungen *einer* Serie wurden folgende Größen der RR, deren Grenzwerte n_D = 0,002 08 bis 0,003 76 betrugen, festgestellt:

Größe der RR n_D = 0,00	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	33	34	37
Zahl d. Bestimmungen	1	2	6	13	9	3	8	16	8	4	2	2	1	1
Mittelwert n_D = 0,00	24													

2. Die Größe der Gesamteiweißrefraktion (GER) und Fehlabweichung ihrer Bestimmung.

Das Prinzip der Bestimmung beruht darauf, daß vom Brechungswert des Serums der Brechungswert der RR und des destillierten

[1]) *Rohrer*, Schweizer med. Wochenschr. **52**, 22, 1922 (Ber. für die ges. Physiol. **15**, 412, 1923.)

[2]) *Neuhausen* und *Rioch*, referiert Ber. f. ges. Physiol. **20**, 196, 1923.

Wassers ($n_D = 1{,}33320$) in Abzug gebracht wird, und findet demgemäß seine Fehlerquellen in der Fehlermöglichkeit der Bestimmung beider Werte. Da aber eine Differenz der Vollrefraktionen bei Parallelbestimmungen nur ausnahmsweise zur Beobachtung kommt und auch dann das Ausmaß des Ablesefehlers nicht überschreitet, kann die diesbezügliche Fehlermöglichkeit außer acht gelassen werden, so daß die Zuverlässigkeit der Bestimmung der GER lediglich von der Zuverlässigkeit der Bestimmung der RR abhängig bleibt: die mittlere Abweichung zwischen zwei Parallelbestimmungen beträgt demnach ebenfalls $n_D = 0{,}00006$, die mittlere $\pm$-Abweichung für eine Bestimmung $n_D = \pm 0{,}00003$.

Über die Größe der GER scheinen in der Literatur systematische Angaben nicht vorzuliegen.

Versuchsreihe 28. In 77 Bestimmungen einer Serie wurden folgende Größen der GER zwischen den Grenzwerten: $n_D = 0{,}01118$ bis $0{,}01774$ festgestellt:

Größe der GER $n_D = 0{,}0$	11	12	13	14	15	16	17
Zahl der Bestimmungen	3	8	23	27	11	4	1
Mittelwert $n_D = 0{,}0$ . .	135						

3. *Die Größe der spezifischen Refraktion des Gesamteiweißes (GE) und Fehlabweichung ihrer Bestimmung.*

Das Prinzip der Bestimmung der spezifischen Refraktion beruht auf dem Vergleich der GER und des maßanalytisch ermittelten GE-Gehalts in dem Sinne, daß die Brechung von 1 g-Proz. Eiweiß auf Grund der Division des ersten durch den zweiten Wert festgesetzt wird. Die mittlere Fehlermöglichkeit ist demgemäß wieder die Summe der mittleren Fehlermöglichkeit beider Bestimmungen, welche für den ersten Wert $n_D = 0{,}00006$, für den zweiten Wert 0,24 g-Proz. (siehe erste Mitteilung) bzw. als mittlere $\pm$-Abweichung für *eine* Bestimmung ausgedrückt $n_D = \pm 0{,}00003$ und $\pm$ 0,12 g-Proz. beträgt.

Der GE-Gehalt wurde mittels der gravimetrischen Maßanalyse (siehe erste Mitteilung) ermittelt.

Der Mittelwert aus 147 gravimetrischen Bestimmungen des GE-Gehalts betrug 6,50 g-Proz. (siehe erste Mitteilung).

Werden die solcherweise an sehr großem Material festgelegten Mittelwerte des GER- und GE-Gehalts zueinander in vorher dargelegter Weise in Beziehung gebracht, einerseits zur Orientierung über die mutmaßliche Größenordnung der spezifischen Refraktion des GE, andererseits zur Berechnung der mittleren Fehlermöglichkeit der Bestimmung, so ergibt sich:

Hinsichtlich der ersteren Fragestellung das Verhältnis: 0,01350 : 6,50 = 0,00208.

Hinsichtlich der zweiten Fragestellung folgende Überlegung: Aus einer Änderung der GER im Ausmaß der mittleren ±-Abweichung ($n_D = 0{,}01350 \pm 03$) resultiert eine Änderung der spezifischen Refraktion im Ausmaß von: $n_D = \pm\, 0{,}00001$, aus einer Änderung des GE-Gehalts im Ausmaß der mittleren ±-Abweichung ($6{,}50 \pm 0{,}12$) resultiert eine Änderung der spezifischen Refraktion im Ausmaß von $n_D = \pm\, 0{,}00004$.

Die mittlere ±-Abweichung der Bestimmung der spezifischen Refraktion des GE erreicht demzufolge bei einer mutmaßlichen Größenanordnung von: $n_D = 0{,}00208$ das Ausmaß von $n_D = \pm\, 0{,}00005$.

Zur genaueren Feststellung der Größenanordnung der spezifischen Refraktion des GE wurden GER- und GE-Gehalt in einer großen Reihe parallel bestimmt.

Versuchsreihe 29. In 69 Bestimmungen einer Serie wurden folgende Größen der spezifischen Refraktion des GE zwischen den Grenzwerten $n_D = 0{,}00177$ bis $0{,}00258$ festgestellt:

Größenordnung der spez. Refraktion des GE $n_D = 0{,}00$	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Zahl der Bestimmungen	2	17	20	16	5	5	2	1	1
Mittelwert $n_D = 0{,}00$	196								

In der Literatur liegen über die Größe der spezifischen Refraktion des GE folgende Angaben vor: *Reiss* (l. c.) bestimmte sie an einem menschlichen Schröpfserum mit $n_D = 0{,}00170$, an einem Pferdeserum mit $n_D = 0{,}00175$ und nahm den Mittelwert $n_D = 0{,}00172$ als Umrechnungsgrundlage auf Grammprozente Eiweiß. *Rohrer* (l. c.) beobachtete in Bestimmungen von 17 (davon fünf menschlichen) Seren einen Mittelwert von $n_D = 0{,}00178$ zwischen den Grenzewrten $n_D = 0{,}00172$ bis $0{,}00184$; *Robertson* (l. c.) nahm als Richtungswert $n_D = 0{,}00195$, *Neuhausen* und *Rioch* (l. c.) $n_D = 0{,}00194$ an.

4. *Die Größe der spezifischen Refraktion der AGF und AHF und die Fehlabweichung ihrer Bestimmung.*

Die Bestimmung der spezifischen Refraktion der Serumeiweißkörpergruppen kann prinzipiell auf zweierlei Weise erfolgen, indem jede Eiweißgruppe entweder in isolierter Lösung (nach Entfernung des Fällungssalzes) oder im Lösungsgemisch des nativen Serums (bei Anwesenheit des Fällungssalzes) auf das Verhältnis der Refraktion zur Konzentration des gelösten Eiweißes untersucht wird.

Die Versuchsbedingungen gestalten sich im ersten Falle so, daß die AGF und AHF elektiv durch Am_2SO_4-Ganz- bzw. Halbsättigung zur Abscheidung gebracht, durch ausgiebiges Waschen mit gesättigter bzw. halbgesättigter Am_2SO_4-Lösung möglichst vollkommen gereinigt

und schließlich durch geeignete Dialyse gegen reines Wasser oder eine leicht besalzte Außenflüssigkeit bekannter Zusammensetzung vom Am_2SO_4 befreit werden. Die im Falle reiner Wasserdialyse ausgefallenen Eiweißkörper der AHF werden durch optimalen Salzzusatz möglichst vollkommen in Lösung gebracht und in der durch Abzentrifugieren völlig geklärten Flüssigkeit die Eiweißrefraktion (durch Abzug der Rest- und Wasserrefraktion von der Vollrefraktion) und -konzentration bestimmt. Im Falle besalzter Außenflüssigkeit gelangt von vornherein nur jener labile Teil der AHF, der bei geringsten denaturierenden Einflüssen seine Löslichkeit irreversibel verliert, zur Abscheidung und wird durch Filtrieren oder in der Zentrifuge entfernt. Doch darf in diesem Falle nicht die Refraktion der Außenflüssigkeit der Restrefraktion des Dialysats gleichgesetzt werden, da der erstere Wert den letzteren, wie eigene Beobachtungen (Versuchsreihe 30) ausnahmslos zeigten, vielfach um bedeutendes überragt.

Die Kritik dieser Versuchsanordnung, in deren Rahmen alle bisherigen Untersuchungen über die spezifische Reaktion der Eiweißkörpergruppen durchgeführt wurden, hat als wichtigste Einwände anzuführen: erstens, daß die Einflüsse, denen die jeweiligen Eiweißkörper im Verlauf des Fällungs-Reinigungs-Dialysierprozesses ausgesetzt sind, mit großer Wahrscheinlichkeit Störungen der physiko-chemischen, vielleicht auch der konstitutiv-chemischen Struktur und damit notwendigerweise Änderungen der spezifischen Refraktion in nicht verfolgbarem Ausmaß verursachen; zweitens, daß im Verlauf des Reinigungs-, namentlich aber des Dialysierverfahrens ein Teil jeder Eiweißfraktion verloren geht und daher auf die schließliche Festsetzung der spezifischen Refraktion ohne Einfluß bleibt, eine Fehlerquelle, die vor allem in Hinblick auf den regelmäßigen Verlust des labilsten AHF-Anteils Bedeutung gewinnen muß.

In der Literatur liegen folgende Angaben, die auf dieser Versuchsanordnung basieren, vor: *Reiss*[1]) bestimmte in zwei Versuchen die spezifische Refraktion von „Euglobulin“ mit $n_D = 0{,}00224$, von „Pseudoglobulin II“ mit $n_D = 0{,}00230$, von „Albumin“ mit $n_D = 0{,}00183$; *Schorer*[2]) in sechs Versuchen die spezifische Refraktion von „Globulin“ mit $n_D = 0{,}00230$ bis $0{,}00270$, im Mittel $n_D = 0{,}00245$, für „Albumin“ mit $n_D = 0{,}00175$ bis $0{,}00198$, im Mittel: $n_D = 0{,}00188$; *Rohrer* (l. c.) die spezifische Refraktion von „Globulin“ in elf Bestimmungen (davon zweimal an menschlichen Seren) mit $n_D = 0{,}00179$ bis $0{,}00180$, im Mittel $0{,}00177$, für „Albumin in zwölf Bestimmungen (davon drei am Menschen) mit $n_D = 0{,}00174$ bis $0{,}00180$, im Mittel $n_D = 0{,}00177$; schließlich *Robertson* (l. c.) die spezifische Refraktion von (Euglobulin) mit $n_D = 0{,}00229$, von „Albumin“ mit $n_D = 0{,}00247$.

---

[1]) *Reiss*, Hofmeisters Beitr. 4, 1904.

[2]) *Schorer*, Korr.-Bl. f. Schweiz. Ärzte 1913, S. 1523.

Eigene Untersuchungen dienten nur orientierenden Zwecken und wurden daher in geringem Umfange durchgeführt; als Versuchsmaterial fanden ausschließlich menschliche Seren Verwendung.

Die Versuchsanordnung, deren genaue Angabe zur Bewertung jedes diesbezüglichen Ergebnisses notwendig erscheint, gestaltete sich im einzelnen folgendermaßen: jedes Serum wurde nach dreifacher Wasserverdünnung mit gesättigter Am_2SO_4-Lösung zu gleichen Teilen versetzt und durch Schleicher-Schüll-Blaubandfilter geschickt; der Niederschlag (AHF) wurde mit halbgesättigter Am_2SO_4-Lösung bis zu negativen Eiweißreaktion gewaschen, das Filtrat und Waschwasser mit feingepulvertem Am_2SO_4 bis zur Sättigung versetzt und wie oben gefiltert. Beide Niederschläge wurden ohne vorherige Wasserauflösung in Pergamentschläuche übertragen, zuerst 3 Tage gegen fließendes Leitungswasser und dann 1 Tag gegen 0,9proz. NaCl-Lösung oder Normosal unter mehrfachem Wechsel der Außenflüssigkeit dialysiert. Die entnommenen Dialysate wurden scharfzentrifugiert, die Bestimmung der Konzentration erfolgte auf gravimetrischem Wege, die Bestimmung der Eiweiß- und Restrefraktion wurde wie im Rahmen der *Robertson*schen Methodik vorgenommen. Bemerkt soll werden, daß die Filterung möglichst beschleunigt und jede Eintrocknung peinlichst vermieden wurde. Trotzdem konnte die dialysierte AHF niemals quantitativ in Lösung übergeführt werden, und selbst das Dialysat der AHF setzte in der hochtourigen Zentrifuge stets ein kleines Sediment ab. Außerdem blieben beide Dialysate auch nach langem Zentrifugieren eine Spur opaleszent. Die Restrefraktion betrug maximal $n_D = 0,00083$, welcher Wert nur wenig unterschritten wurde.

Versuchsreihe 31. Die solcherweise durchgeführte Bestimmung der spezifischen Refraktion der AGF ergab in sechs Dialysaten, deren Eiweißrefraktionen zwischen den Grenzwerten $n_D = 0,00052$ bis 0,00204, deren Eiweißkonzentrationen zwischen den Grenzwerten 0,36 bis 1,03 g-Proz. lagen, die Werte: $n_D = 0,00137$, 0,00144, 0,00148, 0,00174, 0,00193, 0,00204.

Versuchsreihe 32. Die Bestimmung der spezifischen Refraktion der AHF ergab in sieben Dialysaten, deren Eiweißrefraktionen zwischen den Grenzwerten $n_D = 0,00370$ bis 0,00840, deren Eiweißkonzentrationen zwischen den Grenzwerten 1,22 bis 3,64 g-Proz. lagen, die Werte: $n_D = 0,00214$, 0,00216, 0,00230, 0,00271, 0,00308, 0,00312.

Der Mittelwert der spezifischen Refraktion betrug also bei Bestimmung in isolierter Lösung für die Eiweißkörper der AGF $n_D = 0,00166$, für die Eiweißkörpergruppe der AHF $n_D = 0,00265$. Die mittlere $\pm$-Fehlabweichung kann, wie im vorigen Abschnitt mit $n_D = \pm 0,000005$ angenommen werden, da die gleichen Fehlerquellen in Betracht zu ziehen sind.

Versuche zur Bestimmung der spezifischen Refraktion im Lösungsgemisch des nativen Serums bei Anwesenheit des fällenden Salzes wurden bisher nie durchgeführt. Sie schienen auf Grund der ersten Voraussetzung, welche der *Robertson*schen Methodik zugrunde liegt, daß die Gesamtrefraktion die Summe der Teilrefraktionen auch bei Anwesenheit von Am_2SO_4 darstellt und dadurch eine Wechseldifferenz-

berechnung möglich wird, aussichtsreich und verlangten lediglich eine maßanalytische Eiweißbestimmung parallel zur Refraktionsbestimmung.

Die Fehlermöglichkeit der Bestimmung der spezifischen Refraktion der AHF und AGF summiert sich aus der $\pm$-Abweichung des maßanalytischen Eiweißwerts einerseits, der RR und Refraktion des Serum-Am_2SO_4-Filtrats andererseits, wobei die $\pm$-Abweichung des AHF-Eiweißwerts (welche im Rahmen der Differenzrechnung zur Feststellung gelangt) doppelte Größe ($= \pm 0{,}24$ g-Proz.; siehe erste Mitteilung) erreicht. Als mittlere Differenz zwischen zwei Refraktionsbestimmungen des Serums-Am_2SO_4-Filtrats wurde in Versuchsreihe 33 $n_D = 0{,}00005$ beobachtet, die mittlere $\pm$-Abweichung für eine Bestimmung betrug demgemäß $n_D = \pm 0{,}00003$.

Versuchsreihe 33. Der Vergleich der Brechungswerte halbverdünnter Serum-Am_2SO_4-Filtrate ergab in zehn Parallelbestimmungen, deren Grenzrefraktionen $n_D = 0{,}02055$ bis $0{,}02197$ betrugen, einmal keine Differenz, viermal eine solche von $n_D = 0{,}00002$, einmal 0,00005, und 0,00006, zweimal 0,00008, einmal 0,00016.

Die mittlere $\pm$-Abweichung für *eine* Bestimmung der spezifischen Refraktion berechnet sich demzufolge im ungünstigsten Falle (= Addition aller Fehlerquellen) für die AGF mit $n_D = \pm 0{,}0006$ (= Summe aus der $\pm$-Abweichung der Bestimmung des maßanalytischen Eiweißwertes: $n_D = 0{,}00004$, der RR: $n_D = \pm 0{,}00001$, des Serums-Am_2SO_4-Filtrats: $n_D = \pm 0{,}00001$); für die AHF mit $n_D = \pm 0{,}000010$ (= $\pm$-Abweichung der Bestimmung der AGF unter Berücksichtigung der doppelten $\pm$-Abweichung der Bestimmung des maßanalytischen Eiweißwertes: $n_D = 0{,}00008$).

Versuchsanordnung. Durchführung der *Robertson*schen Methodik mit genügend großen Serummengen, um gleichzeitig die Konzentration des Eiweißgehalts im Filtrat des Gemisches: Serum—halbgesättigte Am_2SO_4-Lösung gravimetrisch bestimmen und dem gravimetrisch ermittelten GE-Gehalt gegenüberstellen zu können.

Versuchsreihe 34. Die solcherweise durchgeführte Bestimmung der spezifischen Refraktion der AGF von 23 Seren ergab folgende Werte: $n_D = 0{,}00108$, 0,00114, 0,00124, 0,00131, 0,00135, 0,00138, 0,00155, 0,00158, 0,00165, 0,00169, 0,00175, 0,00185, 0,00192, 0,00195, 0,00200, 0,00224, 0,00225, 0,00228, 0,00240, 0,00242, 0,00253, 0,00266, 0,00291.

Versuchsreihe 35. Die Bestimmung der spezifischen Refraktion der AHF von 20 menschlichen Seren ergab folgende Werte: $n_D = 0{,}00126$, 0,00142, 0,00152, 0,00165, 0,00176, 0,00199, 0,00206, 0,00212, 0,00213, 0,00215, 0,00216, 0,00237, 0,00245, 0,00286, 0,00287, 0,00326, 0,00332, 0,00384, 0,00466, 0,00493.

Der Mittelwert der spezifischen Refraktion betrug also bei Bestimmung im Lösungsgemisch (bei Anwesenheit des Fällungssalzes Am_2SO_4) für die Eiweißkörper der AGF $n_D = 0{,}00187$, für die Eiweißkörper der AHF $n_D = 0{,}00254$.

5. Zusammenfassung und Erörterung der Ergebnisse dieses Abschnittes.

Die systematische experimentelle Prüfung der zu Beginn dieses Abschnitts angeführten Teilfragen konnte mithin für die Beantwortung derselben folgende Tatsachen sicherstellen und allgemein-theoretische Annahmen begründen. (Auf die für die Beurteilung der praktischen Methodik daraus ableitbaren Folgerungen wird in den beiden nächsten Abschnitten eingegangen werden.)

1. Die Größe der RR schwankte um einen Mittelwert $n_D = 0{,}00240$ zwischen den Grenzwerten von $n_D = 0{,}00208$ bis $0{,}00376$, die Ausschlagsbreite von $n_D = 0{,}000168$ erreichte also ungefähr drei Viertel des Mittelwerts: eine einheitliche Größe der RR darf demzufolge nicht angenommen werden. Die mittlere $\pm$-Abweichung ihrer Bestimmung betrug $n_D = \pm 0{,}00003$, somit einen Bruchteil der Ausschlagsbreite und darf demgemäß der Vernachlässigung anheimfallen.

2. Die Größe der GER schwankte um einen Mittelwert von $n_D = 0{,}01350$ zwischen den Grenzwerten $n_D = 0{,}001188$ bis $0{,}001774$, also innerhalb einer Ausschlagsbreite von $n_D = 0{,}0439$; die mittlere $\pm$-Abweichung ihrer Bestimmung betrug $n_D = \pm 0{,}000003$ und darf demnach vernachlässigt werden. Die Ausschlagsbreite der RR betrug mehr als $^1/_{10}$ des Mittelwertes der GER; ihre Vernachlässigung darf demnach auch aus diesem Grunde nicht erfolgen.

3. Die Größe der spezifischen Refraktion des GE schwankte um einen Mittelwert von $n_D = 0{,}00196$ zwischen den Grenzwerten $n_D = 0{,}00177$ bis $0{,}00258$, die Ausschlagsbreite von $n_D = 0{,}00079$ erreichte also $^2/_5$ des Mittelwertes: eine einheitliche Größe der spezifischen Refraktion des GE kann demzufolge nicht aufgestellt werden. Die mittlere $\pm$-Abweichung ihrer Bestimmung betrug $n_D = \pm 0{,}00005$, somit $^1/_{16}$ der Größenordnung der Ausschlagsbreite und darf daher vernachlässigt werden.

4. Die Größe der spezifischen Refraktion der AGF schwankte bei Bestimmung in isolierter Lösung um $n_D = 0{,}00166$ zwischen den Grenzwerten $n_D = 0{,}00137$ bis $0{,}00204$, bei Bestimmung im Lösungsgemisch des nativen Serums (und bei Anwesenheit von Am_2SO_4 in $^1/_8$ gesättigter Lösung) um $n_D = 0{,}00187$ zwischen den Grenzwerten von $n_D = 0{,}00108$ bis $0{,}00291$; die Ausschlagsbreite erreichte also im ersten Falle $n_D = 0{,}00067$ und somit $^2/_5$ des Mittelwertes; im zweiten Falle $n_D = 0{,}00183$ und somit fast die Größe des Mittelwertes: eine einheitliche Größe der spezifischen Refraktion der AGF darf demzufolge nicht angenommen werden. Die mittlere $\pm$-Abweichung betrug im ersten Falle $n_D = \pm 0{,}00005$, im zweiten Falle $n_D = \pm 0{,}00006$, somit ein $^1/_{13}$ bzw. $^1/_{30}$ der Größenordnung der Ausschlagsbreite und darf daher vernachlässigt werden.

Die Größe der spezifischen Refraktion der AHF schwankte bei Bestimmung in isolierter Lösung um $n_D = 0{,}00265$ zwischen den Grenzwerten $n_D = 0{,}00214$ bis $0{,}00312$, bei Bestimmung im Lösungsgemisch (im Rahmen der Differenzberechung) um $n_D = 0{,}0254$ zwischen den Grenzwerten $n_D = 0{,}00126$ bis $0{,}00493$; die Ausschlagsbreite erreichte also im ersten Falle $n_D = 0{,}00098$ und somit fast $^2/_5$ des Mittelwertes, im zweiten Falle $n_D = 0{,}00267$ und somit etwas mehr als den Mittelwert, die mittlere $\pm$-Abweichung betrug im ersten Falle $n_D = \pm\, 0{,}00005$, im zweiten Falle $n_D = +\, 0{,}00010$ und somit $^1/_{20}$ bzw. $^1/_{26}$ der Ausschlagsbreite und darf daher vernachlässigt werden.

Der kritische Vergleich dieser Ergebnisse mit den in der Literatur vorliegenden Angaben hat vor allem festzustellen, daß quantitativ und qualitativ genügende Versuchsreihen an pathologischen Menschenseren nur hinsichtlich des Verhaltens der RR (*Berger* und *Petschacher*), nicht aber hinsichtlich der spezifischen Refraktion vorliegen. Untersuchungen zur Klärung der letzteren Fragestellung verarbeiteten *meist* (*Reiss*, *Rohrer*) oder (anscheinend) *ausschließlich* Tiersera (*Robertson*); wenn aber Menschensera: so einerseits in durchaus ungenügender Anzahl (*Reiss*: 2; *Rohrer*: für die Bestimmung der spezifischen Refraktion des GE: 5, der AGF: 3, der AHF: 2), andererseits (anscheinend) stets von normalen Versuchspersonen. Weiter wurden alle spezifischen Refraktionen an Eiweißkörpern an isolierter Lösung bestimmt, ein Vorgehen, das entsprechend den früheren Ausführungen besonders geeignet scheint, **künstlich** verhältnismäßig einheitliche Werte zu erzielen. Die einzige größere vorliegende Versuchsreihe zur Bestimmung der spezifischen Refraktion, die anscheinend auch pathologische Seren verarbeitete (*Schorer*: sechs Bestimmungen), brachte denn auch bereits erhebliche Differenzen der spezifischen Refraktion der AGF und der AHF zur Feststellung. Aus allen diesen Gründen erscheint es daher verständlich, einerseits, daß bei dem vorliegenden eigenen, um ein Vielfaches größeren Versuchsmaterial so bedeutende Ausschlagsbreiten beobachtet wurden, andererseits, daß die beobachteten Mittelwerte verhältnismäßig geringe Abweichungen von den Mittelwerten der Literatur zeigten.

Hinsichtlich allgemein theoretischer Fragestellung aber scheinen die vorliegenden Ergebnisse dafür zu sprechen, daß jede einzelne Serumeiweißkörpergruppe sowohl physikalisch-chemisch als auch strukturchemisch eine Komplexgruppe von Eiweißkörpern verschiedener Eigenschaften darstellt, deren quantitative Zusammensetzung namentlich bei pathologischen Seren ausgeprägten und wechselnden Änderungen unterliegt. Von einer einheitlich-konstanten spezifischen Refraktion des Gesamtserumeiweißes oder der einzelnen Serumeiweißkörpergruppen kann daher überhaupt nicht gesprochen werden. Sicher

scheint nur angenommen werden zu können, daß die spezifische Refraktion der AHF ausnahmslos nnd in mehr oder weniger bedeutendem, immer aber weit über der Grenze der Fehlbestimmung gelegenem Ausmaße die spezifische Refraktion der AGF überragt.

Nachdem solcherweise die experimentelle Kritik der zweiten eingangs zur Prüfung aufgestellten Grundlage der refraktometrischen Eiweißbestimmung mit ungünstigem Ergebnis für die Beurteilung der praktischen Methodik abgeschlossen war, mußte schließlich als letztes Kriterium der direkte Vergleich der mit refraktometrischer Methodik und direkter Maßanalyse erhaltenen Resultate herangezogen werden.

X. Die grundsätzliche Kritik und experimentelle Prüfung der Bestimmung des GE nach Reiss und Robertson.

1. Die grundsätzliche Kritik der GE-Bestimmung nach *Reiss* hat also anzuführen, daß entsprechend den vorausgehenden Feststellungen keine der beiden Grundlagen der Methodik: weder die annähernd gleiche Größe der RR, noch die Einheitlichkeit und Konstanz der spezifischen Refraktion des GE zu Recht besteht.

In der Literatur liegen über den Vergleich der refraktometrisch nach *Reiss* und maßanalytisch erhaltenen GE-Werte folgende Angaben vor:

Reiss selbst erklärte in seiner letzten zusammenfassenden Darstellung (Handb. d. biol. Arbeitsmethoden), daß der refraktometrische Eiweißwert nicht ohne weiteres mit auf andere Art ausgeführten Eiweißanalysen übereinstimmt, vielmehr nach Vergleichsanalysen von *Böhme* zu hoch liegt, was aber praktisch keine Rolle spielt, wenn man nur die refraktometrischen Werte unter sich vergleicht. *Berger* und *Petschacher* (l. c.) verglichen den GE-Gehalt von zwölf Seren nach *Reiss* und *Kjeldahl* und fanden in allen Bestimmungen Differenzen im Sinne: *Reiss* > *Kjeldahl*, und zwar im Ausmaß von 0,04 bis 1,53 g-Proz., im Mittel 0,93 g-Proz., ebenso *Hafner*[1]) in vier Bestimmungen im Ausmaß von 0,37 bis 0,69 g-Proz., im Mittel 0,52 g-Proz., und *Frey*[2]) in 25 Bestimmungen im Ausmaß von 0,3 bis 2,2 g-Proz., im Mittel 1,14 g-Proz.

Eigene Untersuchungen, verglichen in 79 Doppelanalysen den gravimetrisch und refraktometrisch nach *Reiss* erhaltenen Eiweißwert, ergaben in allen Bestimmungen einen kleineren ersten und größeren zweiten Wert:

Versuchsreihe 36. Die GE-Werte nach *Reiss* betrugen 6,3 bis 9,7 g-Proz., die gravimetrisch ermittelten 4,1 bis 8,2 g-Proz. Die Differenzen verhielten sich folgendermaßen:

---

[1]) *Hafner*, Schm. A. 1924, S. 101.
[2]) *v. Frey*, Bz. 1924, S. 148.

Differenz in g-Proz.	0,1 —	0,5 —	1,0 —	1,5 —	2,0 —	2,5 —
Zahl der Bestimmungen	3	13	30	27	4	2
Mittelwert in g-Proz.	1,3					

Die grundsätzliche Kritik der GE-Bestimmung nach *Robertson*, welche auf der Summation der gesondert festgestellten AGF- und AHF-Gehalte beruht, hat anzuführen, daß die Grundlage der Methodik: die Einheitlichkeit und Konstanz der spezifischen Refraktion der beiden Eiweißkörpergruppen nicht angenommen werden kann.

In der Literatur liegt über den Vergleich der refraktometrisch nach *Robertson* und maßanalytisch gewonnenen GE-Werte anscheinend nur eine Angabe von *Berger* und *Petschacher* (l. c.) vor, welche in zwölf Parallelbestimmungen nach *Robertson* und *Kjeldahl* siebenmal Differenzen im Sinne: *Robertson* > *Kjeldahl* im Ausmaß von 0,05 bis 0,61 g-Proz. und fünfmal im entgegengesetzten Sinne im Ausmaß von 0,02 bis 0,84 g-Proz. feststellten; die Differenz betrug im Gesamtmittel unter Abstraktion von der Ausschlagsrichtung 0,32 g-Proz.

Eigene Parallelbestimmungen nach der *Robertson*schen und gravimetrischen Methodik hatten folgendes Ergebnis:

Versuchsreihe 37. Der Vergleich ergab in 26 Parallelanalysen, deren GE-Grenzwerte zwischen 5,7 bis 8,3 g-Proz. (*Robertson*) und 4,2 bis 8,2 g-Proz. (Gravimetrie) lagen: dreimal keine Differenz, 19 mal eine solche im Sinne: *Robertson* > Gravimetrie, im Ausmaß von 0,1 bis 2,1 g-Proz., viermal im entgegengesetzten Sinne im Ausmaß von 0,3 bis 0,6 g-Proz.

Differenz in g-Proz.	0,0	0,1 —	0,5 —	1,0 —	1,5 —
Zahl der Bestimmungen	3	7	5	7	4
Mittelwert in g-Proz.	0,7				

Über den Vergleich der refraktometrisch nach *Reiss* und *Robertson* ermittelten Werte finden sich in der Literatur folgende Angaben:

Berger und *Petschacher* (l. c.) fanden in 39 Parallelbestimmungen 38 mal eine Differenz im Sinne: *Reiss* > *Robertson* im Ausmaß von 0,2 bis 2,1 g-Proz., einmal im entgegengesetzten Sinne im Ausmaß von 0,4 g-Proz., im Gesamtmittel einen Unterschied von 0,86 g-Proz.; *Hafner* (l. c.) verzeichnete in vier Parallelbestimmungen immer Differenzen im Sinne: *Reiss* > *Robertson* im Ausmaß von 0,25 bis 0,34 g-Proz., im Mittel 0,30 g-Proz.

Eigene Paralleluntersuchungen ergaben folgendes Resultat:

Versuchsreihe 38. In 28 Vergleichsanalysen, deren Grenzwerte 6,3 bis 9,9 g-Proz. (*Reiss*) und 5,7 bis 8,9 g-Proz. (*Robertson*) betrugen, fand sich ausnahmslos ein Unterschied im Sinne: *Reiss* > *Robertson* im Ausmaß von 0,3 bis 1,6 g-Proz.

Differenz in g-Proz.	0,1 —	0,5 —	1,0 —	1,5 —
Zahl der Bestimmungen	4	14	7	3
Mittelwert in g-Proz.	0,8			

Der kritische Vergleich der eigenen mit den in der Literatur vorgebrachten Befunden kann also feststellen:

1. Daß der GE-Wert nach *Reiss* den refraktometrisch nach *Robertson* und maßanalytisch (*Kjeldahl*, Gravimetrie) ermittelten ausnahmslos um Bedeutendes, jedoch in verschiedenem Ausmaße überragt.

2. Daß der GE-Wert nach *Robertson* den maßanalytisch gefundenen sowohl über- als unterschreitet, und zwar in einem Ausmaße, das im Rahmen der um mehr als die Hälfte kleineren Versuchsreihe von *Berger* und *Petschacher* als gerade noch praktisch zulässig, im Rahmen der eigenen aber als praktisch zu groß erkannt wurde.

Vom theoretischen Standpunkte aus betrachtet, stehen diese experimentellen Befunde in völliger Übereinstimmung mit den Ergebnissen, welche auf Grund der vorausgehenden grundsätzlichen Kritik angenommen werden konnten, und zwar:

Hinsichtlich der Methodik von *Reiss*: weil die spezifische Refraktion einerseits zu niedrig angesetzt wird und so bei Umrechnung der absoluten Refraktion auf Gramm-Prozent Eiweiß einen zu hohen Wert bewirken muß, andererseits keine Konstanz besitzt und daher ein unregelmäßiges Ausmaß der Erhöhung notwendigerweise weiter zur Folge hat (aus welchem Grunde auch die Annahme von *Reiss*, daß die refraktometrisch ermittelten Werte wenigstens als untereinander mit gleicher Fehlergröße behaftete Vergleichswerte anzusehen seien, nicht zulässig erscheint).

Hinsichtlich der Methodik von *Robertson* aus folgender Erwägung: da einerseits die von *Robertson* angenommenen Richtungswerte der spezifischen Refraktion der AHF und AGF die Mittelwerte derselben deutlich unterschreiten, andererseits aber der Richtungswert der spezifischen Refraktion der AHF den Mittelwert des GE überragt, muß einerseits, wenn sich die auf die AHF und AGF entfallenden Teilrefraktionen ungefähr die Wage halten, der nach *Robertson* eremittelte GE-Gehalt zu groß, andererseits, wenn sich das Gleichgewicht der Refraktionen der AGF und AHF zugunsten der letzteren verschiebt, das GE zu klein berechnet werden.

Hinsichtlich der Frage der praktischen Brauchbarkeit beider Methoden scheint die Forderung begründet, ihre Verwendung nur zu orientierenden Zwecken oder bei Erwartung sehr großer Ausschläge in Betracht zu ziehen, doch möge andererseits bemerkt sein, daß dieses Urteil verständlicherweise nur auf die Umrechnung in Gramm-Prozent

Eiweiß Bezug nimmt und den großen Wert der reinen Refraktionsbestimmung an sich für verschiedenste, entsprechend gewählte Fragestellungen, deren Untersuchung der viel gröberen Maßanalyse überhaupt unzugänglich bleibt, nicht zu schmälern vermag.

XI. Die grundsätzliche Kritik und experimentelle Prüfung der Bestimmung der AGF und AHF nach Robertson.

Die grundsätzliche Kritik hat die gleichen schon oben bei Besprechung des GE-Gehalts nach *Robertson* geführten Tatsachen in Betracht zu ziehen.

Hinsichtlich experimenteller Prüfung scheinen in der Literatur nur die Angaben von *Berger* und *Petschacher* (l. c.) vorzuliegen, welche in zwölf Vergleichsanalysen (welche sechs normale und sechs pathologische Seren betrafen) der AHF nach *Robertson* und *Kjeldahl* ($MgSO_4$-Fällung!) achtmal Differenzen im Sinne: *Kjeldahl* > *Robertson* im Ausmaß von 0,06 bis 0,52 g-Proz., viermal im entgegengesetzten Sinne im Ausmaß von 0,05 bis 0,48 g-Proz., im Gesamtmittel eine Differenz von 0,28 g-Proz. fanden; bei Umrechnung auf Prozente des GE-Gehalts ergab sich einmal eine Differenz von 14 Proz., einmal von 6 Proz. und zehnmal unter 5 Proz.

Eigene Untersuchungen hatten folgendes Ergebnis:

Versuchsreihe 39. Der Vergleich der nach *Robertson* und gravimetrisch bestimmten Größe der AHF ergab in 25 Parallelanalysen 14 mal eine Differenz im Sinne: Gravimetrie > *Robertson* im Ausmaß von 0,2 bis 2,3 g-Proz., zehnmal im entgegengesetzten Sinne im Ausmaß von 0,1 bis 2,8 g-Proz., einmal keine Differenz.

Differenz in g-Proz.	0,0	0,1 —	0,5 —	1,0 —	1,5 —	2,0 —	2,5 —
Zahl der Bestimmungen	1	6	2	8	5	1	2
Mittelwert in g-Proz. .				1,16			

Versuchsreihe 40. Der Vergleich der an den gleichen Fällen bestimmten Größen der AGF ergab zehnmal eine Differenz im Sinne: Gravimetrie > als *Robertson* im Ausmaß von 0,1 bis 1,5 g-Proz., 14 mal im entgegengesetzten Sinne im Ausmaß von 0,2 bis 3,6 g-Proz., einmal keine Differenz.

Differenz in g-Proz.	0,0	0,1 —	0,5 —	1,0 —	1,5 —	2,0 —	2,5 —
Zahl der Bestimmungen	1	6	6	4	3	3	2
Mittelwert in g-Proz. .				1,13			

Die Umrechnung auf Prozent des GE-Gehalts ergab in den gleichen Fällen folgende Differenzen:

Für die AHF 13 mal im Sinne: Gravimetrie > *Robertson* im Ausmaß von 2 bis 35 Proz., zwölfmal im Sinne: Gravimetrie < *Robertson* im Ausmaß von 2 bis 30 Proz., für die AGF im umgekehrten Verhältnis.

Differenz in g-Proz.	0,1 —	0,5 —	1,0 —	1,5 —
Zahl der Bestimmungen	4	14	7	3
Mittelwert in g-Proz.	0,8			

Der kritische Vergleich der eigenen mit den in der Literatur vorgebrachten Befunden kann also feststellen:

1. Daß der GE-Wert nach *Reiss* den refraktometrisch nach *Robertson* und maßanalytisch (*Kjeldahl*, Gravimetrie) ermittelten ausnahmslos um Bedeutendes, jedoch in verschiedenem Ausmaße überragt.

2. Daß der GE-Wert nach *Robertson* den maßanalytisch gefundenen sowohl über- als unterschreitet, und zwar in einem Ausmaße, das im Rahmen der um mehr als die Hälfte kleineren Versuchsreihe von *Berger* und *Petschacher* als gerade noch praktisch zulässig, im Rahmen der eigenen aber als praktisch zu groß erkannt wurde.

Vom theoretischen Standpunkte aus betrachtet, stehen diese experimentellen Befunde in völliger Übereinstimmung mit den Ergebnissen, welche auf Grund der vorausgehenden grundsätzlichen Kritik angenommen werden konnten, und zwar:

Hinsichtlich der Methodik von *Reiss*: weil die spezifische Refraktion einerseits zu niedrig angesetzt wird und so bei Umrechnung der absoluten Refraktion auf Gramm-Prozent Eiweiß einen zu hohen Wert bewirken muß, andererseits keine Konstanz besitzt und daher ein unregelmäßiges Ausmaß der Erhöhung notwendigerweise weiter zur Folge hat (aus welchem Grunde auch die Annahme von *Reiss*, daß die refraktometrisch ermittelten Werte wenigstens als untereinander mit gleicher Fehlergröße behaftete Vergleichswerte anzusehen seien, nicht zulässig erscheint).

Hinsichtlich der Methodik von *Robertson* aus folgender Erwägung: da einerseits die von *Robertson* angenommenen Richtungswerte der spezifischen Refraktion der AHF und AGF die Mittelwerte derselben deutlich unterschreiten, andererseits aber der Richtungswert der spezifischen Refraktion der AHF den Mittelwert des GE überragt, muß einerseits, wenn sich die auf die AHF und AGF entfallenden Teilrefraktionen ungefähr die Wage halten, der nach *Robertson* eremittelte GE-Gehalt zu groß, andererseits, wenn sich das Gleichgewicht der Refraktionen der AGF und AHF zugunsten der letzteren verschiebt, das GE zu klein berechnet werden.

Hinsichtlich der Frage der praktischen Brauchbarkeit beider Methoden scheint die Forderung begründet, ihre Verwendung nur zu orientierenden Zwecken oder bei Erwartung sehr großer Ausschläge in Betracht zu ziehen, doch möge andererseits bemerkt sein, daß dieses Urteil verständlicherweise nur auf die Umrechnung in Gramm-Prozent

Eiweiß Bezug nimmt und den großen Wert der reinen Refraktionsbestimmung an sich für verschiedenste, entsprechend gewählte Fragestellungen, deren Untersuchung der viel gröberen Maßanalyse überhaupt unzugänglich bleibt, nicht zu schmälern vermag.

XI. Die grundsätzliche Kritik und experimentelle Prüfung der Bestimmung der AGF und AHF nach Robertson.

Die grundsätzliche Kritik hat die gleichen schon oben bei Besprechung des GE-Gehalts nach *Robertson* geführten Tatsachen in Betracht zu ziehen.

Hinsichtlich experimenteller Prüfung scheinen in der Literatur nur die Angaben von *Berger* und *Petschacher* (l. c.) vorzuliegen, welche in zwölf Vergleichsanalysen (welche sechs normale und sechs pathologische Seren betrafen) der AHF nach *Robertson* und *Kjeldahl* ($MgSO_4$-Fällung!) achtmal Differenzen im Sinne: *Kjeldahl* > *Robertson* im Ausmaß von 0,06 bis 0,52 g-Proz., viermal im entgegengesetzten Sinne im Ausmaß von 0,05 bis 0,48 g-Proz., im Gesamtmittel eine Differenz von 0,28 g-Proz. fanden; bei Umrechnung auf Prozente des GE-Gehalts ergab sich einmal eine Differenz von 14 Proz., einmal von 6 Proz. und zehnmal unter 5 Proz.

Eigene Untersuchungen hatten folgendes Ergebnis:

Versuchsreihe 39. Der Vergleich der nach *Robertson* und gravimetrisch bestimmten Größe der AHF ergab in 25 Parallelanalysen 14mal eine Differenz im Sinne: Gravimetrie > *Robertson* im Ausmaß von 0,2 bis 2,3 g-Proz., zehnmal im entgegengesetzten Sinne im Ausmaß von 0,1 bis 2,8 g-Proz., einmal keine Differenz.

Differenz in g-Proz.	0,0	0,1 —	0,5 —	1,0 —	1,5 —	2,0 —	2,5 —
Zahl der Bestimmungen	1	6	2	8	5	1	2
Mittelwert in g-Proz. .				1,16			

Versuchsreihe 40. Der Vergleich der an den gleichen Fällen bestimmten Größen der AGF ergab zehnmal eine Differenz im Sinne: Gravimetrie > als *Robertson* im Ausmaß von 0,1 bis 1,5 g-Proz., 14mal im entgegengesetzten Sinne im Ausmaß von 0,2 bis 3,6 g-Proz., einmal keine Differenz.

Differenz in g-Proz.	0,0	0,1 —	0,5 —	1,0 —	1,5 —	2,0 —	2,5 —
Zahl der Bestimmungen	1	6	6	4	3	3	2
Mittelwert in g-Proz. .				1,13			

Die Umrechnung auf Prozent des GE-Gehalts ergab in den gleichen Fällen folgende Differenzen:

Für die AHF 13mal im Sinne: Gravimetrie > *Robertson* im Ausmaß von 2 bis 35 Proz., zwölfmal im Sinne: Gravimetrie < *Robertson* im Ausmaß von 2 bis 30 Proz., für die AGF im umgekehrten Verhältnis.

Differenz in Proz. des GE	1 —	5 —	10 —	20 —	30 —
Zahl der Bestimmungen	5	3	7	7	3
Mittelwert in Proz. des GE . . .			15		

Das eigene (unter Berücksichtigung lediglich der pathologischen Fälle *Berger* und *Petschacher*) an viermal größerem Material gewonnene Resultat war somit wesentlich ungünstiger als das von *Berger* und *Petschacher* angegebene. Die Ursache dafür dürfte wohl in dem verhältnismäßig kleinen Umfang ihrer Versuchsreihe zu suchen sein. Im übrigen mußte dieses ungenügende praktische Resultat auf Grund des Ergebnisses der früheren Untersuchungen über das Verhalten der spezifischen Refraktion erwartet werden.

Hinsichtlich der praktischen Anwendung der *Robertson*schen Bestimmung der Eiweißkörpergruppen darf nur eine unbedingte Ablehnung in Betracht gezogen werden, da neben vielfach guter Übereinstimmung (in jenen Fällen, wo die jeweiligen spezifischen Refraktionen den *Robertson*schen Richtungswerten nahe- oder gleichkommen), auch mit schwersten Differenzen zu rechnen ist, die eine Verwertung des so erhaltenen Versuchsergebnisses unmöglich erscheinen lassen.

Über die Methodik der quantitativen Bestimmung der Eiweißkörpergruppen des menschlichen Blutserums. III.

Von

W. Starlinger und K. Hartl.

(Aus der II. medizinischen Universitätsklinik in Wien.)

(Eingegangen am 29. April 1925.)

Nachdem in der vorausgehenden Mitteilung die experimentelle Prüfung der refraktometrischen Methodik beendet wurde, soll im folgenden über das Ergebnis der Kritik der restlichen optischen Methoden (unter einstweiligem Ausschluß der Kolorimetrie und Diaphanometrie) und der kombinierten Viskosirefraktometrie berichtet werden.

XII. Die grundsätzliche Kritik der Interferometrie, Polarimetrie und Nephelometrie als Grundlage maßanalytischer Eiweißkörperbestimmung.

1. *Die Interferometrie* beruht auf der Bestimmung des Brechungsvermögens und unterscheidet sich von der Refraktometrie durch eine größere Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Leistung. Da jedoch die ablehnende Kritik der einfachen Refraktometrie ihre Begründung nicht in unzureichender Exaktheit der Bestimmung des jeweiligen Brechungswertes, also nicht in einer Unzulänglichkeit der technisch-methodischen Grundlage, sondern in dem Nachweis ungenügender prinzipiell-methodischer Grundlage fand, somit also alle grundsätzlichen Einwände (hinsichtlich des Nichtbestehens einer einheitlich-konstanten spezifischen Refraktion des GE und der Eiweißkörpergruppen) gegen die Verwendung der einfachen Refraktometrie in gleicher Weise auch gegenüber der Interferometrie Geltung besitzen, muß jedes auf interferometrischer Grundlage aufgebaute Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eiweißkörpern grundsätzlich abgewiesen werden.

In der Literatur liegt ein auf interferometrischer Grundlage aufgebautes Verfahren zur Bestimmung der AHF und AGF von *Hirsch* und *Kochler*[1]) vor: Als unbedingte technische Notwendigkeit hat die Verwendung genauest (reichsamtlich) geeichter Pipetten zu gelten, seit deren Verwendung

[1]) *Hirsch-Kochler*, Fermentforsch. **6**, 1922.

die Autoren im Gegensatz zu früheren Versuchen von *Hirsch-Langenmaß*[1]) erst verwertbare Resultate verzeichnen konnten. Die methodische Durchführung darf als grundsätzlich analog dem *Robertson*schen Verfahren bezeichnet werden: zehnfach verdünntes Serum wird einerseits mit der gleichen Menge gesättigter Am_2SO_4-Lösung versetzt, andererseits mit der gleichen Menge n/10 Essigsäure gekocht; die erhaltenen klaren Zentrifugate werden gegen halbgesättigte Am_2SO_4-Lösung bzw. n/20 Essigsäure interferometriert, die abgelesenen Trommelteile mit Hilfe eines Diagramms in *Pulfrich*sche Skalenteile transponiert und unter Benutzung der *Reiss*schen Werte für die spezifische Refraktion der einzelnen Eiweißkörpergruppen in Grammprozente umgerechnet [*Gutzeit*[2])].

Gutzeit brachte anscheinend als bisher einziger das Verfahren in Anwendung und beobachtete bei Seren mit niedrigem Eiweißgehalt ein oft über 100 Proz. des GE betragendes Ansteigen der AHF, trotzdem in der Restflüssigkeit der Am_2SO_4-Fällung reichlich Eiweiß (also AGF) nachweisbar blieb, eine Erscheinung, als deren Ursache er eine Konzentrations- und daher Refraktionsverminderung des Am_2SO_4-Fällungszentrifugats infolge Salzadsorption an die AHF-Fällung annahm. Ohne auf die Erörterung der Zulässigkeit dieses Erklärungsversuchs einzugehen, bleibe lediglich festgestellt, daß *Gutzeit* das interferometrische Verfahren als „mit unübersehbaren" Fehlerquellen behaftet ablehnte.

Eine direkte maßanalytische Kontrolle des Verfahrens wurde bisher weder von den Autoren noch von anderer Seite beigebracht. Auf eigene experimentelle Prüfung konnte gemäß den eingangs gegebenen Feststellungen verzichtet werden.

2. *Die Polarimetrie* beruht auf der Bestimmung des Drehungsvermögens; ihre Verwendbarkeit zur Maßanalyse von Eiweißkörpern hängt von dem Nachweis der Berechtigung folgender zwei Grundannahmen ab: erstens, daß die jeweils untersuchte Eiweißkörpergruppe eine einheitlich-konstante spezifische Drehung besitzt und zweitens, daß die Gesamtdrehung eines Eiweißkristalloidgemisches die Summe der einzelnen Drehungsanteile darstellt und somit eine Differenzrechnung grundsätzlich gestattet.

Hinreichend umfangreiche Untersuchungen über die spezifische Drehung des Gesamteiweißes und seiner Teilgruppen, namentlich menschlichen (oder gar pathologischen) Serums scheinen in der Literatur nicht vorzuliegen. Die wenigen diesbezüglichen Angaben stammen aus älterer Zeit, stützen sich nur auf vereinzelte Bestimmungen und beziehen sich meist auf Rind und Pferd: Die spezifische Drehung des „Albumins" beträgt nach *Meisel*[3]) $[\alpha]_D = -61{,}0$ bis $61{,}2^0$, nach *Starke*[4]) $[\alpha]_D = -60{,}2^0$, nach *Maximowitsch*[5]) $[\alpha]_D = -47{,}5^0$, die spezifische Drehung des „Globulins" nach Angabe von *Samuely-Strauss*[6]) $[\alpha_D] = -47{,}8^0$.

---

[1]) *Hirsch-Langenmaß*, Fermentforsch. **3**, 1920.
[2]) *Gutzeit*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **39**, 1924.
[3]) *Meisel*, zitiert nach Oppenheimers Handb. d. Biochem. **1**, 1909.
[4]) *Starke*, ref. Malys Jahrb. **11**, 17.
[5]) *Maximowitsch*, ebendaselbst, **31**, 34.
[6]) *Samuely-Strauss*, Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethoden 1922.

Hinsichtlich der zweiten prinzipiellen Frage ist bekannt, einerseits, daß Drehungsvermögen und Konzentration nicht in direkter Proportion stehen, andererseits, daß die Anwesenheit fremder, an sich optisch inaktiver Körper (Salze) Variationen der Polarisationskurve bedingt.

Es kann daher als unwahrscheinlich angenommen werden, daß die beiden notwendigen Grundannahmen in der Tat zu Recht bestehen. Von einer eigenen diesbezüglichen experimentellen Prüfung wurde Abstand genommen, weil selbst im Falle günstigen Ergebnisses die technisch-methodische Grundlage als nicht genügend angesehen werden muß, wie aus späteren Erwägungen hervorgehen wird.

In der Literatur liegt eine polarimetrische Methodik zur quantitativen Bestimmung des GE und seiner Teilfraktionen anscheinend nicht vor, doch hat *Rondoni*[1]) zu anderen Zwecken (auf die hier nicht näher eingegangen werden kann) eine Versuchsanordnung ausgearbeitet, welche gleichzeitig als einzige Möglichkeit polarimetrischer quantitativer Eiweißkörperbestimmung bezeichnet werden muß. Die Darstellung der Methodik erfolgt hier im Sinne angestrebter Maßanalyse (die, wie schon bemerkt, *Rondoni* selbst ferne lag):

Serum wird einerseits mit zwei Teilen 0,9proz. NaCl-Lösung, andererseits mit Wasser und gesättigter Am_2SO_4-Lösung im Verhältnis 2 : 1 : 3 versetzt, also ebenfalls dreifach verdünnt und nach Abzentrifugieren der gefällten AHF im *Landolt-Lippich*schen Dreischattenapparat in der 20-mm-Röhre polarimetriert. Unter der Annahme, daß das anwesende Am_2SO_4 keine Störung verursacht, ergibt die einfache Differenzrechnung den auf die AHF und AGF entfallenden Drehungsanteil, der unter Berücksichtigung der entsprechenden spezifischen Drehung auf absolute Werte umgerechnet werden könnte.

Doch hat die Kritik der methodisch-technischen Grundlage unter Abstraktion von der Problematik der beiden prinzipiellen Voraussetzungen der methodischen Durchführung folgendes zu bedenken: Da einerseits die Genauigkeit der Ablesung im *Landolt-Lippich*schen Apparat theoretisch $\pm$ 0,01°, praktisch höchstens $\pm$ 0,02° beträgt (welcher Fehler bei stark gefärbten Seren noch größer wird), andererseits die Gesamtdrehung unverdünnten Serums nur ausnahmsweise — 1,0° überschreitet, die Drehung des dreifach verdünnten Serums also meist um — 0,3°, die Drehung des Am_2SO_4-Filtrats bei annähernd normaler Verteilung der AHF und AGF um 0,15° schwankt, erreicht die lediglich technisch-methodisch bedingte Mindestfehlerquelle der Bestimmung der auf die AGF entfallenden Drehung $\pm$ $^1/_7$ des Wertes, also bei Annahme von 7,0 g-Proz. GE und 3,5 g-Proz. AGF $\pm$ 0,5 g-Proz. Ein noch größeres Fehlerausmaß gilt verständlicherweise für die Bestimmung der AGF.

Die technisch-methodische Grundlage muß daher, wie oben schon vorweggenommen, als nicht hinreichend bezeichnet werden.

3. *Die Nephelometrie* beruht auf der Messung des abgebeugten Tyndallichts, ihre Verwendbarkeit zur quantitativen Bestimmung von Eiweißkörpern wurde von *Rona* und *Kleinmann*[2]) geprüft und

[1]) *Rondoni*, Zeitschr. f. Immunforsch. **34**, 1922.

[2]) *Rona-Kleinmann*, diese Zeitschr. **140**, 1923.

nachgewiesen. Als Voraussetzung hat zu gelten: einerseits die Herstellung homogen-stabiler Trübungen, andererseits der Vergleich nur äquidisperser Systeme.

Diese Forderungen werden nach *Rona* und *Kleinmann* (l. c.) hinsichtlich der Bestimmung des GE-Gehalts von Serum im Rahmen folgender Versuchsanordnung erfüllt: Serum wird mit 0,9proz. NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 100 verdünnt und darauf mit der gleichen Menge 25proz. HCl und der doppelten Menge Sulfosalicylsäure versetzt (die erzielte Trübung bleibt etwa 1 Stunde homogen stabil). Nach etwa 5 Minuten wird gegen eine in gleicher Weise hergestellte Standardlösung von bekannter Konzentration nephelometriert. Die untere Grenze der bestimmbaren Eiweißkonzentration beträgt 0,003 g-Proz. der durchschnittliche praktische Bestimmungsfehler ± 0,3 Proz., also bei Annahme von 7,0 g-Proz. GE etwa ± 0,02 g-Proz.

Die technisch-methodische Grundlage muß somit als sehr gut bezeichnet werden.

Da nach *Rona* und *Kleinmann* (l. c.) gesättigte Am_2SO_4-Lösung bis zu einer Menge von 3,0 ccm in 25 ccm Gesamtvolumen der Endmischung keinen nachweisbaren Fehler verursacht, steht der nephelometrischen Bestimmung auch der AHF und AGF nichts im Wege.

Die methodische Durchführung könnte in diesem Falle folgendermaßen gestaltet werden: Serum wird mit der doppelten Menge Wasser und dreifachen Menge gesättigter Am_2SO_4-Lösung zur Fällung der AHF versetzt, zentrifugiert und die klare mit Am_2SO_4 halbgesättigte Lösung der AGF mit 0,9proz. NaCl-Lösung im Verhältnis von 1 : 10 verdünnt, wobei einerseits eine Eiweißkonzentration erreicht wird, welche in den Ablesebereich fällt, andererseits die Konzentration des Am_2SO_4 weit unter der Fehlergrenze bleibt. Der nephelometrische Vergleich erfolgt gegen das eigene Vollserum, die Differenzrechnung ergibt unter entsprechender Berücksichtigung der stattgehabten Verdünnung unmittelbar das Verhältnis der AHF zur AGF, die Umrechnung in Grammprozente bedarf der Parallelnephelometrie gegen eine Standardlösung von bekannter Konzentration.
Bei extremen Abweichungen der AGF-Konzentration von der Norm nach oben oder unten in einem Ausmaß, daß der Ablesebereich nicht eingehalten wird, müßte lediglich eine entsprechende Änderung des Verdünnungsausmaßes mit 0,9proz. NaCl-Lösung zur Durchführung kommen.

Die experimentelle Prüfung dieser methodischen Möglichkeit konnte bisher in einstweiliger Ermangelung eines eigenen Nephelometers nicht durchgeführt werden, doch scheint ein theoretischer Einwand kaum vorgebracht werden zu können.

In der Literatur liegt nur eine Angabe über die Verwendung der Nephelometrie zur quantitativen Bestimmung des GE-Gehalts und der Serumeiweißkörper von seiten *Rusznyaks*[1]) vor: In zwei Erlenmeyerkolben werden je 0,1 ccm Serum unter fortwährendem Umschwenken einerseits mit je 25,0 ccm halbgesättigter Am_2SO_4-Lösung zur Fällung der AHF,

[1]) *Rusznyak*, diese Zeitschr. **133**, 1922.

andererseits mit 50,0 ccm ganzgesättigter (n/10 HCl) Am_2SO_4-Lösung zur Fällung des GE versetzt und die so entstandenen Trübungen nach einigen Minuten gegeneinander nephelometriert. Die Berechnung des AHF/AGF-Verhältnisses erfolgt mit Berücksichtigung der Verdünnung im Rahmen der üblichen Differenzrechnung. Die Umrechnung auf absolute Werte in Grammprozenten bedarf *einer* direkten Maßanalyse in jeder Serie. Die gravimetrische Kontrolle ergab in vier Parallelanalysen sehr gute Übereinstimmung. Als Nephelometer kam ein nach Angaben von *Rusznyak* umgearbeitetes Chromophotometer von *Plesch*[1]) zur Verwendung.

Das Verfahren wurde von *Rona* und *Kleinmann* (l. c.) unter Hinweis auf die Nichtbeachtung des nephelometrischen Grundgesetzes (Vergleich nur äquidisperser Lösungen) und die Instabilität der erzeugten Trübung einer abweisenden Kritik unterzogen, welche jedoch von *Rusznyak*[2]) auf Grund seiner guten praktisch-experimentellen Ergebnisse zurückgewiesen wurde.

Doch konnte auch *Salomon*[3]) wegen ungleichmäßiger Flockung die Nephelometrie im Rahmen der Methode von *Rusznyak* nicht verwenden.

Eigene Erfahrungen über die Methodik stehen in Ermangelung eines eigenen Nephelometers nicht zur Verfügung.

Zusammenfassend darf jedenfalls angenommen werden, daß die Einführung der nephelometrischen Methodik in Anbetracht ihrer großen zeit- und arbeitstechnischen Expeditivität und Zuverlässigkeit eine sehr wertvolle Bereicherung der quantitativen Maßanalyse des GE und der Serumeiweißkörpergruppen bedeutet, namentlich wenn eine Dauerstandardlösung, deren Ermangelung derzeit noch jeweils *eine* direkte maßanalytische Bestimmung in *jeder* Serie erforderlich macht, zur Verfügung stehen wird. Eigene Versuche in dieser Richtung sind im Anschluß an die Untersuchungen von *Mestrezat*[4]) im Gange. Doch dürfte der allgemeineren Verwendung der Nephelometrie der außerordentlich hohe Preis, den die Anschaffung des hochwertigen Instruments von *Schmidt* und *Haensch* oder selbst der Umbau eines Chromophotometers der gleichen Firma im Sinne *Rusznyaks* erfordert, bis auf weiteres im Wege stehen.

4. Über die eingehende experimentelle Kritik der diaphanometrischen und kolorimetrischen Methodik wird nach Abschluß der diesbezüglichen Versuche in einer folgenden letzten Mitteilung berichtet werden.

XIII. Die kombinierte Viskosirefraktometrie als Grundlage der Bestimmung des „Globulin-Albumin"-Verhältnisses.

Das Prinzip der kombinierten Viskosirefraktometrie zur Bestimmung des Verhältnisses der „Globuline" zu den „Albuminen"

---

[1]) *Rusznyak*, diese Zeitschr. **133**, 1922.

[2]) *Derselbe*, ebendaselbst **144**, 1924.

[3]) *Salomon*, Zeitschr. f. klin. Med. **99**, 1924.

[4]) *Mestrezat*, Bull. de la soc. de chim. biol. **3**, 1924.

beruht auf der Annahme eines gesetzmäßigen Interferierens dieser beiden physikalischen Zustandsgrößen.

Die in solcher Richtung von *Naegeli*[1]) inaugurierte, von *Rohrer*[2]) ausgearbeitete Methodik gestaltet sich demgemäß so, daß die jeweils in *Pulfrich*schen Skalenteilen abgelesene Refraktion und die mittels eines hochwertigen Viskosimeters (von *Rohrer* wurde zu diesem Zwecke eine eigene Modifikation des *Hess*schen Instruments angegeben) gemessene Viskosität in ein Koordinatensystem (Ordinate für die Refraktometer-, Abszisse für die Viskositätswerte) eingetragen werden, worauf der Verlauf jener Kurve, auf die der Schnittpunkt zu liegen kommt, direkt das Verhältnis der Eiweißkörpergruppen angibt. Die Kurven stellen sich als das Ergebnis kombiniert refrakto-viskosimetrischer Untersuchungen an AHF-AGF-Mischungen bekannter Zusammensetzung dar und stützen sich somit lediglich auf empirische Eichung.

Das Verfahren beruht also auf folgenden Voraussetzungen: erstens, daß einerseits eine konstant-einheitliche, untereinander gleiche spezifische Refraktion der AHF und AGF, andererseits eine konstant-einheitliche, untereinander verschiedene spezifische Viskosität der AHF und AGF besteht, zweitens, daß einerseits der auf die Nichteiweißkörper des Serums entfallende Anteil der Gesamtrefraktion und -viskosität als konstanter Wert angesehen werden darf, andererseits die Viskosität der Eiweißkörper keiner Beeinflussung durch die Nichteiweißkörper unterliegt.

Die Kritik dieser methodischen Grundlagen hat anzuführen:

1. Daß eine konstant-einheitliche und untereinander gleiche spezifische Refraktion der beiden Eiweißkörpergruppen zum mindesten bei pathologischen Seren nicht besteht (siehe die vorausgehende Mitteilung);

2. Daß eine einwandfreie experimentelle Bestimmung der spezifischen Viskosität einer Eiweißkörpergruppe, die nativ nur im Gemisch mit anderen vorkommt, überhaupt als unmöglich bezeichnet werden muß, da der Viskositätswert der Lösung eines *isolierten* (im Rahmen der Isolierung also eingreifendsten Änderungen der physiko-chemischen Struktur unterworfenen) Eiweißkörpers in Anbetracht der außerordentlichen Empfindlichkeit gerade der Viskositätsqualität von Eiweiß über seine *native* Viskosität nichts aussagen kann; ein Einwand, der namentlich für das so labile Eiweiß der AHF Geltung beanspruchen darf, wie denn auch die gefundenen Werte der spezifischen Viskosität der AHF nicht nur zwischen verschiedenen Autoren [*Rohrer*, l. c.,

---

[1]) *Naegeli*, Kongr. f. inn. Med. 1913.

[2]) *Rohrer*, Deutsch. klin. Med. **121**, 1917.

Handowsky[1]), *Gutzeit*, l. c.], sondern auch im Rahmen der gleichen Versuchsreihe (auch der Originalreihe *Rohrers* selbst) erhebliche Abweichungen aufweisen;

3. Daß die Restrefraktion nicht als annähernd konstanter Wert angesehen werden darf (siehe die vorausgehende Mitteilung), während die Restviskosität nur geringen Schwankungen zwischen 0,02 bis 0,04 unterworfen zu sein scheint [*Rohrer*, l. c., *Petschacher*[2])];

4. Daß die Beeinflussung der Viskosität der Eiweißkörper durch die Nichteiweißkörper bzw. durch das jeweilige physiko-chemische Milieu des Serums [*Wanner*[3]), *Hellwig-Neuschloss*[4]), *Fodor-Fischer*[5]), *Neuschloss-Trelles*[6]), *Spiro*[7]), *Berger* und *Petschacher*, l. c., *Hafner*, l. c.] a priori als wahrscheinlich angesehen werden muß.

Zusammenfassend darf also festgestellt werden, daß selbst unter Absehung von den beiden letzten Einwänden die beiden ersten grundlegenden Annahmen hinsichtlich des Verhaltens der spezifischen Refraktion und der spezifischen Viskosität als nicht zu Recht bestehend, bzw. nicht erwiesen bezeichnet werden müssen.

Hinsichtlich der experimentellen Prüfung des Verfahrens mit Standardmethoden liegen in der Literatur folgende Angaben vor: *Berger* und *Petschacher* (l. c.) fanden in zwölf Parallelbestimmungen (Mikrokjeldahl-$MgSO_4$-Fällung) einmal identische Werte, elfmal Differenzen im Sinne: „Globulin" (*Kjeldahl*) $<$ „Globulin" (*Rohrer*) im Ausmaß von 4 bis 33 Proz. des GE-Gehalts, im Mittel 14,5 Proz. des GE; *v. Frey* (l. c.) beobachtete in 18 Parallelanalysen (Mikrokjeldahl-$MgSO_4$-Fällung) 15 mal Differenzen im Sinne: „Globulin" (*Kjeldahl*) $>$ „Globulin" (*Rohrer*) im Ausmaß von 4 bis 24 Proz. des GE und dreimal Differenzen im umgekehrten Sinne im Ausmaß von 23 bis 37 Proz., im Gesamtmittel von 14,5 Proz. des GE; das Ergebnis der Untersuchungen von *Fodor* und *Fischer* (l. c.) und *Neuschloss* und *Trelles* (l. c.) im Sinne völliger Diskrepanz zwischen Höhe der „relativen Viskosität" und „Globulin-Albumin"-Verhältnis (Kjeldahl-$MgSO_4$-Fällung) kann nur mittelbar verwertet werden, da kein direkter Vergleich mit dem Verfahren von *Rohrer* selbst durchgeführt wurde.

Eigene Untersuchungen hatten folgendes Resultat:

Versuchsreihe 41. In 25 Parallelbestimmungen mit Hilfe der Gravimetrie und Am_2SO_4-Fällung ergaben sich gravimetrisch bestimmte Verhältniswerte zwischen 30 : 70 bis 76 : 24, *Rohrer*sche Verhältniszahlen zwischen 15 : 85 bis 56 : 44. Die 24 mal beobachteten Differenzen zeigten 18 mal eine Ausschlagsrichtung: AHF (Gravimetrie) $>$ „Globulin" (*Rohrer*) im Ausmaß von 6 bis 28 Proz., sechsmal eine entgegengesetzte Ausschlags-

---

[1]) *Handowsky*, Münch. med. Wochenschr. **22**, 1924.
[2]) *Petschacher*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **41**, 1924.
[3]) *Wanner*, Korr.-Bl. f. Schweiz. Ärzte **32**, 1922.
[4]) *Hellwig-Neuschloss*, Klin. Wochenschr. **40**, 20, 1922.
[5]) *Fodor-Fischer*, Gyn. M. **29**, 1922.
[6]) *Neuschloss-Trelles*, Klin. Wochenschr. **45**, 1923.
[7]) *Spiro*, ebendaselbst 1923, S. 37—38.

richtung im Ausmaß von 3 bis 15 Proz., im Gesamtmittel von 12 Proz. des GE.

Differenz in Proz. des GE	1 —	5 —	10 —	15 —	20 —	25 —
Zahl der Bestimmungen	3	6	6	7	2	1
Mittelwert in Proz. des GE . . .	12					

Die experimentelle Eichung an Standardmethoden hatte also das nach der oben durchgeführten grundsätzlichen Kritik erwartete Ergebnis durchaus ungenügender Übereinstimmung zur Folge.

Bemerkenswert erscheint jedoch bei Berücksichtigung der Literatur, daß *Berger* und *Petschacher* eine Überhöhung des nach *Rohrer* ermittelten „Globulin“-Wertes beobachteten, während die Untersuchungen von *v. Frey* und unsere eigenen, die sich auf das größte vorliegende Material stützen, das Gegenteil zu erweisen scheinen.

Anhangsweise sei noch der an sich bedeutungslose Vergleich der Verfahren von *Rohrer* und *Robertson* durchgeführt.

In der Literatur liegt in dieser Hinsicht lediglich eine Angabe von *Berger* und *Petschacher* (l. c.) vor, welche bei 39 Doppelbestimmungen einmal Übereinstimmung und 38mal Differenzen ausnahmslos im Sinne: AHF (*Robertson*) < „Globulin“ (*Rohrer*) im Ausmaß von 3 bis 42 Proz., im Mittel von 25 Proz. des GE beobachteten.

Eigene Untersuchungen hatten folgendes Ergebnis:

Versuchsreihe 42. In 27 Parallelbestimmungen ergaben sich nach *Rohrer* ermittelte Verhältniswerte zwischen 15 : 85 bis 56 : 44, nach *Robertson* zwischen 6 : 94 bis 73 : 27 Proz. Die Differenzen wiesen zehnmal eine Ausschlagsrichtung im Sinne: AHF (*Robertson*) < „Globulin“ (*Rohrer*) im Ausmaß von 1 : 20 Proz., 17mal im entgegengesetzten Sinne im Ausmaß von 1 : 29 Proz., im Mittel 10 Proz. des GE auf.

Differenz in Proz. des GE	1 —	5 —	10 —	15 —	20 —	25 —
Zahl der Bestimmungen	6	10	4	2	1	2
Mittelwert in Proz. des GE . . .	10					

Auf die kombinierte Viskosirefraktometrie bzw. auf die kombinierte Untersuchung der Viskosität und des GE zur Bestimmung der sogenannten „spezifischen (relativen) Viskosität“ wird in anderem Rahmen ausführlich eingegangen werden, da ihre Kritik nicht in den Bereich der vorliegenden Fragestellung fällt, welche sich lediglich mit der Kritik der *Maßanalyse* der Serumeiweißkörper zu beschäftigen hatte.

Über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Dextrinierung der Stärke durch gereinigte Malzamylase.

Von

T. Chrząszcz, Z. Bidziński und **A. Krause.**

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Technologie der Universität Poznań.)

(Eingegangen am 1. Mai 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Allgemeiner Teil.

Seit den Arbeiten *Sörensens* und weiterhin *Michaelis'* und seiner Mitarbeiter über die Wasserstoffionenkonzentration kamen die Enzyme als besonders gegen die Wasserstoffionenkonzentration empfindliche organische Katalysatoren in den Vordergrund. Diese Tatsache führte notwendigerweise zur Bestimmung derjenigen Wasserstoffionenkonzentration, bei welcher die enzymatischen Vorgänge am günstigsten verlaufen. Weiterhin wurde festgestellt, daß für die günstigste Wirkung jedes Enzyms eine bestimmte Wasserstoffionenkonzentration existiert. Auch für die Amylase bzw. für ihre drei enzymatischen Kräfte, und zwar für die stärkeverflüssigende, die — dextrinierende und die — verzuckernde Kraft ist diese Abhängigkeit des enzymatischen Prozesses von der Wasserstoffionenkonzentration festgestellt worden.

Betrachtet man die diesbezüglichen neueren Arbeiten, so findet man nach *W. Windisch*, *W. Dietrich* und *A. Beyer* die günstigste Wirkung für die verflüssigende Kraft bei einer Wasserstoffionenkonzentration $p_H = 5{,}03$ bis 5,16[1]), für die dextrinierende Kraft nach *Adler* bei $p_H = 4{,}83$[2]), nach *Sjöberg* bei $p_H = 5$, wobei die optimale Wirkungszone zwischen $p_H = 4$ bis 6 liegt[3]). *Chrząszcz* bestimmt bei 40° C die optimale Zone zwischen $p_H = 4{,}7$ bis 5,28[4]). Am umfangreichsten sind die Arbeiten über die verzuckernde Kraft der Amylase; so bestimmt *L. Adler* ihre optimale Wirkung bei

---

[1]) *W. Windisch*, *W. Dietrich* und *A. Beyer*, Wochenschr. f. Brauerei **40**, 49, 1923.

[2]) *L. Adler*, diese Zeitschr. **77**, 146, 1916.

[3]) *K. Sjöberg*, ebendaselbst **133**, 294, 1922.

[4]) *T. Chrząszcz*, ebendaselbst **150**, 60, 1924.

$p_H = 4{,}87$ bis $4{,}95$[1]), *Sherman, Thomas* und *Baldwin* bei $p_H = 4{,}4$ bis $4{,}5$[2]), *W. Windisch, W. Dietrich* und *P. Kolbach* bei $p_H = 4{,}26$ mit einer optimalen Wirkungszone zwischen $p_H = 3{,}9$ bis $4{,}7$[3]), *H. v. Euler* und *Swanberg* geben $p_H = 5$ an[4]), *A. Hahn*[5]) $p_H = 4{,}7$ bis $4{,}9$, *K. Sjöberg* $p_H = 5$ bis $5{,}4$[6]), *H. Lüers* und *W. Wasmund* $p_H = 4{,}9$[7]), *H. Ernström* $p_H = 5{,}17$[8]).

Aus dem Gesagten geht hervor, daß nicht einmal für ein und dieselbe amylolytische Kraft das optimale p_H von den verschiedenen Autoren übereinstimmend angegeben ist. Es erhebt sich infolgedessen die Frage, was hier die Ursache dieser Unstimmigkeiten ist; liegt hier vielleicht ein Versuchsfehler vor, oder haben wir es hier mit besonderen, noch nicht aufgeklärten Eigenschaften oder Verhalten der Amylase zu tun? Im ersten Falle hätten wir einen allzu großen Fehler, den man kaum als wirklichen Grund für die obengenannten Unterschiede annehmen dürfte. Im voraus kann man also die zweite Ursache geltend machen. Dafür spricht auch eine Untersuchung von *T. Chrząszcz*[9]), der den Vorgang der Stärkespaltung durch Einwirkung von Malzauszügen auf die Stärke bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration untersucht hat. Die vorliegenden Untersuchungen sollen von neuem dieses Ergebnis prüfen und erweitern bei Anwendung gereinigter Amylase.

Experimenteller Teil.

Zur Ausführung der Versuche wurde gereinigte Weizenmalzamylase angewandt. Wir wählten diese Amylase deshalb, weil sie, wie unsere früheren Untersuchungen zeigen[10]), von allen Getreideamylasen am stärksten und gegen allerlei Einflüsse am empfindlichsten ist.

Das durch 12 Tage lange Keimung bei etwa 15° C erhaltene Weizenmalz wurde bei einer 45° C nicht überschreitenden Temperatur getrocknet, alsdann zu Mehl vermahlen. Dieses Mahlgut diente zur Herstellung von 10proz. wässerigen Auszügen, die durch ½stündiges Ausschütteln mit destilliertem Wasser erhalten wurden; danach wurden sie klar filtriert. Die eingeengten Auszüge dienten zur Darstellung reiner Amylase, die schließlich durch fraktionierte Fällung mit Alkohol zur Ausscheidung gelangte. Nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator wurde sie gepulvert und im Exsikkator aufbewahrt. Für unsere Versuche wurde sie in Form von 0,015-, 0,15- und 0,3proz. wässerigen Lösungen angewandt.

Solche wässerigen Amylaselösungen ließen wir auf 0,2proz. Stärkekleister einwirken, der durch 10 Minuten langes Erhitzen bei 98° C erhalten

---

[1]) l. c.

[2]) *H. C. Sherman, A. W. Thomas* und *M. C. Baldwin*, Journ. Amer. Soc. **41**, 231, 1919.

[3]) *W. Windisch, W. Dietrich* und *P. Kolbach*, Wochenschr. f. Brauerei **39**, 219, 1922.

[4]) *H. v. Euler* und *O. Swanberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **99**, 110, 1920.

[5]) *A. Hahn*, Zeitschr. f. Biol. **74**, 217, 1922.

[6]) *K. Sjöberg*, diese Zeitschr. **133**, 218, 1922.

[7]) *H. Lüers* und *W. Wasmund*, Fermentforsch. **5**, Nr. 3, 1922.

[8]) *E. Ernström*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **119**, 190, 1922.

[9]) *T. Chrząszcz*, Roczniki Nauk Rolniczych, **13**, Nr. 2, 1925.

[10]) l. c.

wurde (Temperatur gemessen im Kolben). Nach dem Abkühlen wurde der Stärkekleister in Portionen von 100 ccm in Jenaer Glaskolben gebracht, darauf mit derjenigen Menge Acetatpuffergemisch versetzt, die zur Herstellung einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration nötig war, und schließlich in einen Thermostaten gestellt, der die gewünschte Temperatur zeigte. Nach ³/₄stündigem Anwärmen, nachdem der Stärkekleister die Temperatur des Thermostaten angenommen hatte, wurden 5 ccm Amylaselösung hinzugefügt. Die Einwirkung der Amylase auf die Stärke wurde an ihrer dextrinierenden Kraft gemessen, und zwar auf zweifache Art.

1. Man mißt die zur Dextrinierung einer bestimmten Menge Stärke nötige Zeit. Der Verlauf der Stärkespaltung wurde mit Hilfe der Jodreaktion verfolgt, die gewöhnlich bis zur hellgelben Farbe geführt wurde. Die Zeit, in welcher die Reaktion verlief, ließ auf die Wirkungsenergie der Amylase gegebenenfalls schließen.

2. Man bestimmt die in der Zeiteinheit dextrinierte Menge Stärke. Zu diesem Zwecke wurde die von uns entsprechend modifizierte Methode von *Sjöberg*[1]) angewandt, vermittelst der durch Farbreaktion der Grenzwert (limes) bestimmt wurde. Auf diese Weise wurde für jede Temperatur bei bestimmter Wasserstoffionenkonzentration die in 1 Minute dextrinierte Menge Kubikzentimeter Stärke bestimmt. Da die blauen Farben der Jodreaktion noch außerhalb eines deutlich wahrzunehmenden Stärkeabbaus liegen, die gelben Farben andererseits eine zu weitgehende Stärkespaltung bedeuten, so können daher nur die innerhalb des Farbenbereichs blau mit violettem Stich bis rotgelb liegenden Farben in ihren einzelnen Nüancen in Betracht kommen, um die Menge dextrinierter Stärke zu bestimmen. Eine Farbe, die direkt zur Bestimmung des sogenannten limes dienen kann, ist rotviolett. In denjenigen Fällen, wo die Dextrinierung der Stärke noch nicht bis zu dem eben gekennzeichneten Punkte rotviolett gelangt ist, oder falls die Reaktion denselben schon überschritten haben sollte, ist durch Interpolation der limes festzustellen, z. B.:

Zur Bestimmung der Menge dextrinierter Stärke wurden sechs Proben derart angeordnet, daß wir sechs Kolben nacheinander mit 2proz. Stärkekleister beschickten, und zwar den ersten mit 10 ccm, den zweiten mit 20 ccm, dann 40, 60, 80 und 100 ccm. Nachdem sie ³/₄ Stunden im Thermostaten bei 45° C verblieben waren, fügten wir zu jedem Kolben 5 ccm 0,15proz. Amylaselösung hinzu. Alle 5 Minuten wurden nun, um den Reaktionsverlauf zu prüfen, von jedem Kolben Proben (2 ccm) entnommen und die Jodreaktion beobachtet. Das Ergebnis ist nachstehend zusammengestellt.

Tabelle I. Bei Einwirkung von 5 ccm 0,15proz. Amylaselösung auf:

Nach Min.	10 ccm	20 ccm	40 ccm	60 ccm	80 ccm	100 ccm	Menge d. dextrinierten Stärke in limes	*d*
5	rotgelb	violett	blau				17,5	3,5
10	gelb	rotgelb	rotviolett	blauviolett			40	4
15		gelb	hellrot	rotviolett	violett		60	4
20			gelbrot	rot	rotviolett		80	4
25			gelb	rotgelb	dunkelrot	rotviolett	100	4
30				dunkelgelb	rot	rot (Stich viol.)		
35				gelb	rotgelb	dunkelrot		

[1]) l. c.

Zwecks Ermittlung der dextrinierten Menge Stärke („limes") mit Hilfe der Jodreaktion ist es nötig, in der ersten Reihe die Farbe rotviolett aufzusuchen. Da jedoch diese Farbe nicht gefaßt wurde, so muß entsprechend interpoliert werden. Hätten wir die Farben in der Reihenfolge — rot bis violett — gefunden, so würde der limes direkt der arithmetischen Mitte entsprechen. In unserem Beispiel erhielten wir bei Einwirkung von Amylaselösung auf 10 ccm Stärkekleister nach 5 Minuten durch die Jodreaktion eine rotgelbe, bei 20 ccm Stärkekleister in derselben Zeit eine violette Färbung. Der limes wird also nicht 15, sondern einer etwas höheren Zahl, etwa 17,5 entsprechen.

Die nach 10 Minuten dextrinierte Menge Stärke ist in der zweiten wagerechten Reihe der Tabelle I zu suchen. Dort findet man direkt die Färbung rotviolett, die bei 40 ccm Stärkekleister mittels Jodreaktion erhalten wurde. Der limes entspricht in diesem Falle also 40 ccm dextrinierter Stärke. Auf ähnliche Art sind in obiger Tabelle I die limes für die nächsten Reihen zu bestimmen.

Aus der in einer bestimmten Zeit dextrinierten Menge Stärke (limes) läßt sich diejenige Menge Stärke finden, die in 1 Minute dextriniert wurde. Man hat nur den limes durch die Anzahl Minuten zu dividieren, d. h. durch diejenige Zeit, die zur Erlangung der rotvioletten Färbung nötig war. Die Zahl „*d*", die man so erhält, gibt die Anzahl Kubikzentimeter Stärkekleister an, die in 1 Minute dextriniert werden. Die oben erhaltenen Zahlen „*d*" sind im gegebenen Falle, unabhängig von Zeit, fast ausnahmslos konstant.

Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentrationseinwirkung auf die Dextrinierung der Stärke bei verschiedenen Temperaturen.

Um den Einfluß festzustellen, den die Wasserstoffionen auf den Dextrinierungsprozeß ausüben, bedienten wir uns eines 2proz. Stärkekleisters, den wir in Portionen von 100 ccm in eine Anzahl Glaskolben brachten, mit Acetatpuffergemischen versetzten und mit destilliertem Wasser auf ein bestimmtes Volumen (110 ccm) auffüllten. Dann wurden sie in einen Thermostaten von gewünschter Temperatur hineingestellt. Nach 45 Minuten, nachdem die Stärke die Temperatur des Thermostaten angenommen hatte, wurden je 5 ccm 0,15proz. Amylaselösung zugegeben. Der Verlauf der Reaktion wurde derart verfolgt, daß in bestimmten Zeitabständen 2 ccm Flüssigkeit entnommen und zu 10 ccm Jodlösung (0,2 g im Liter) zugegeben wurde. Der Verlauf der Dextrinierung wurde bis zur hellgelben Jodfärbung gebracht und gleichzeitig die diesem Zeitpunkt entsprechende Zeit notiert. In Fällen, wo die hellgelbe Jodreaktion nach hinreichend langer Zeit nicht erhalten werden konnte, wurde diejenige Färbung notiert, die in selbiger Zeit erhalten wurde. Die Versuche wurden in Intervallen von 5^0 C zwischen 20^0 und 65^0 C ausgeführt, bei einer Wasserstoffionenkonzentration zwischen p_H 3,8 bis 7,2.

Wie aus der Tabelle II ersichtlich, ist der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration von der Temperatur abhängig, in welcher die Amylase auf die Stärke einwirkt, eine Tatsache, die es wahrscheinlich

Tabelle II.

Bei Einwirkung von 5 ccm 0,15 proz. Amylase auf 100 ccm 2 proz. Stärkekleister wurden durch die Jodreaktion die unten angegebenen Farben in folgender Zeit erhalten:

Bei p_H	20° C	25° C	30° C	35° C	40° C	45° C	50° C	55° C	60° C	65° C
	Minuten	Minuten	Minuten	Minuten	Minuten	Minuten	Minuten	Minuten	Minuten	Minuten
3,8	492 gelb	384 gelb	270 gelb	226 gelb	162 gelb	220 gelb	260 rot	390 violett	390 blau	390 blau
4,0	231 „	143 „	130 „	124 „	115 „	110 „	103 gelb	390 rot	390 violett	390 blau m. viol. Stich
4,2	170½ „	107 „	84 „	73 „	54 „	46 „	44 „	101 gelb	390 rot	390 blauviolett
4,4	170 „	106 „	82 „	64 „	46 „	39 „	33 „	41 „	75 gelb	390 rotviolett
4,6	171 „	106 „	82 „	62 „	45 „	37 „	31 „	32 „	37 „	390 rotgelb
4,8	173 „	107 „	83 „	63 „	45½ „	37 „	30 „	30 „	32 „	75 gelb
5,0	175 „	108 „	84 „	64 „	46 „	38 „	31 „	30 „	32 „	51 „
5,2	178 „	109 „	86 „	65 „	47 „	39 „	32 „	31 „	34 „	58 „
5,4	183 „	111 „	88 „	67 „	49 „	40 „	33 „	32 „	40 „	67 „
5,6	190 „	119 „	90 „	70 „	52 „	41 „	34 „	34 „	50 „	77 „
5,8	204 „	136 „	94 „	73 „	55 „	44 „	36 „	38 „	68 „	102 „
6,0	213 „	158 „	107 „	79 „	61 „	52 „	43 „	46 „	109 „	390 hellrot
6,2	227 „	180 „	119 „	91 „	70 „	66 „	52 „	66 „	152 „	390 rot
6,4	240 „	207 „	135 „	112 „	82 „	79 „	64 „	95 „	360 „	390 rotviolett
6,6	281 „	274 „	165 „	126 „	97 „	96 „	78 „	182 „	360 hellrot	390 violettblau
7,2	429 „	418 „	230 „	180 „	150 „	132 „	98 „	342 „	360 violett	390 blau

machte, daß auch das Massenwirkungsgesetz und die Schutzwirkung der Stärke die Reaktion beeinflusse. Um dies zu zeigen, arbeiteten wir auch mit doppeltstarken Amylaselösungen, also 0,3proz., nach oben beschriebener Methode, andererseits in zehnfach verdünnter Lösung, ohne jedoch das Verhältnis der Amylase zur Stärke zu ändern, d. h. bei Einwirkung von 0,015proz. Amylaselösung auf 0,2proz. Stärkekleister. Tabelle III zeigt die diesbezüglich erhaltenen Zahlen.

Auf Grund der Ergebnisse der Tabelle III können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

a) Eine feste optimale Wasserstoffionenkonzentration für die dextrinierende Kraft der Amylase gibt es nicht. Für jede Temperatur — innerhalb gewisser Grenzen — ergibt sich eine andere Wasserstoffionenkonzentration als optimale. Im Bereich einer p_H von 3,8 bis 7,2 verschiebt sich zwischen 20 und 75° C die optimale Wasserstoffionenkonzentration von $p_H = 4,4$ bei 20° C bis $p_H = 5,4$ bei 75° C, d. h. das Optimum der dextrinierenden Wirkung verschiebt sich nach der alkalischen Seite hin.

b) Eine gewisse Acidität ist für die Wirkung der Amylase günstig. Jedoch wirkt die Acidität gleichzeitig auf die Amylase schädigend, und zwar um so mehr, je höher die Temperatur ist.

c) Außer dem optimalen p_H kann man für jede Temperatur die optimale Zone ermitteln. Bis zu etwa 40° C breitet sich diese zu beiden Seiten des Optimums aus, sowohl in acider als auch in alkalischer Richtung. Oberhalb dieser Temperatur zeigt sich, je größer die Wasserstoffionenkonzentration, die zunehmende Temperatur als immer schädlicher. Mit steigender Temperatur neigt und breitet sich die optimale Zone nach der alkalischen Seite zu aus. Gleichzeitig beginnt damit die optimale Zone enger zu werden, zunächst langsam, nachher oberhalb 60° C schnell, so daß sie schließlich in ein scharfes, durch eine bestimmte p_H gekennzeichnetes Optimum übergeht. In den hohen Temperaturen beeinflußt eine verhältnismäßig geringe Verschiebung der p_H schon deutlich die Wirkung der Amylase.

d) Das Massenwirkungsgesetz zeigt ebenso seine Gültigkeit. So verträgt eine im Verhältnis zur Stärke vorhandene größere Amylasemenge größere Acidität. Da überdies die Stärke auf die Amylase die Wirkung eines Schutzkolloids ausübt, verursacht eine größere Stärkekonzentration, daß die Amylase verhältnismäßig größere Acidität verträgt bzw. für ihre günstige Wirkung benötigt.

e) Die Wirkung der Wasserstoffionenkonzentration kennzeichnet sich auf zweifache Art, reaktionsfördernd und hemmend. Je höher die Temperatur, desto größer ist der fördernde Einfluß; gleichzeitig aber ist auch die Vernichtung des Enzyms eine größere. Dement-

Tabelle III.

Bei p_H	Bei Einwirkung von 5 ccm					
	0,3 proz. Amylaselösung auf 100 ccm 2 proz. Stärkekleister bei					0,015 proz. Amylaselös. auf 100 ccm 0,2 proz. Stärkekleister bei
	35° C	55° C	65° C	70° C	75° C	45° C
	wurden in der folgenden Zeit die folgenden Jodreaktionen erhalten:					
	Minuten	Minuten	Minuten	Minuten	Minuten	Minuten
3,8	160 gelb	—	—	—	—	—
4,0	50 „	170 gelb	390 violett	265 blau	—	250 violett
4,2	35 „	$31^1/_2$ „	390 dunkelrot	265 blau m. viol. Stich	—	250 gelbrot
4,4	$33^1/_2$ „	$17^1/_2$ „	390 hellrot	265 violett	210 blau	188 gelb
4,6	33 „	16 „	$22^1/_2$ gelb	265 rot	210 blau m. viol. Stich	127 „
4,8	34 „	16 „	20 „	262 gelb	210 violettblau	112 „
5,0	35 „	$16^1/_2$ „	21 „	50 „	210 violett	102 „
5,2	36 „	17 „	22 „	47 „	210 rotviolett	97 „
5,4	37 „	$17^1/_2$ „	26 „	75 „	210 rotbraun	104 „
5,6	38 „	18 „	31 „	105 „	210 rotviolett hell	166 „
5,8	39 „	20 „	39 „	265 gelbrot	210 violettrot	200 „
6,0	43 „	24 „	57 „	265 dunkelrot	210 violett	250 gelbrot
6,2	50 „	31 „	89 „	265 „	210 violettblau	250 rot
6,4	58 „	38 „	176 „	265 rotviolett	210 blau m. viol. Stich	250 dunkelrot
6,6	69 „	50 „	390 rotgelb	265 blauviolett	210 blau	250 rotviolett
7,2	126 „	78 „	390 blau m. viol. Stich	265 blau	210 „	250 violett

sprechend verschiebt sich auch das Optimum und die optimale Zone in alkalischer Richtung. Alle Bedingungen, die auf die Amylase schützend einwirken, werden eine größere Acidität für die günstigste Wirkung zulassen. Andererseits werden solche Agenzien, die auf die Amylase vernichtend wirken, notwendigerweise die für die Dextrinierung günstigste p_H nach der alkalischen Seite hin verschieben.

f) Die optimale Wasserstoffionenkonzentration, ebenso die optimale Zone für das Dextrinierungsvermögen der Amylase ist daher keine feste Größe, sondern abhängig von einer Reihe von Agenzien, wie Temperatur, Massenwirkungsgesetz und anderes, also schützenden, fördernden oder hemmenden Einflüssen, die gleichzeitig auf die Amylase einwirken. Diese Beobachtungen stehen mit unseren früheren im Einklang, die das Verhalten der Amylase wässeriger Malzauszüge bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration behandeln. Es ist jedoch hervorzuheben, daß bei Einwirkung von Malzauszügen die erwähnten Unterschiede noch deutlicher hervortreten[1]).

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante.

Für monomolekulare Reaktionen, zu welchen die Dextrinierung der Stärke zu rechnen ist, läßt sich folgende Gleichung für die Reaktionsgeschwindigkeit aufstellen: Wenn dx eine unendliche kleine Stoffmenge bedeutet, die in der Zeit dt umgesetzt wird, dann ist die Reaktionsgeschwindigkeit $\frac{dx}{dt}$ proportional der noch nicht umgesetzten Stoffmenge $a - x$, wenn a die Anfangskonzentration der Stoffmenge vor der Umsetzung bedeutet; also:

$$\frac{dx}{dt} = K(a - x).$$

Durch Integrieren erhält man:

$$K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a - x}.$$

Gewöhnlich ersetzt man den natürlichen Logarithmus durch den dekadischen, so daß die Gleichung folgende Form annimmt:

$$K = \frac{1}{0{,}4343 \, . \, t} \log \frac{a}{a - x}.$$

K ist die Konstante der Reaktionsgeschwindigkeit; sie gibt die in der Zeiteinheit umgesetzte Anzahl Mol an.

Um aus obiger Gleichung K zu berechnen, müssen die Größen t, a und x bekannt sein; a und t sind ohne weiteres bekannt, bleibt also

---

[1]) *T. Chrząszcz*, Roczniki Nauk Rolniczych **13**, Nr. 2, 1925.

nur x zu bestimmen. Die Zahl x steht im Abhängigkeitsverhältnis zum oben besprochenen limes bzw. der Zahl d, welche die in 1 Minute dextrinierte Anzahl Kubikzentimeter Stärkekleister angibt und aus dem nach der Jodmethode erhaltenen limes-Farbton bestimmt werden kann. Die Bestimmung des limes bildete also die Voraussetzung zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Durch Bestimmung des limes-Farbtons wurden die für die zuvor festgestellten optimalen p_H entsprechenden Zahlen d ermittelt für Temperaturen zwischen 20 und 60° C in Abständen von 5 zu 5°.

Tabelle IV.

Es wurden die Werte d gefunden bei Einwirkung von 5 ccm 0,15proz. Amylase auf 100 ccm 2proz. Stärkekleister.

Bei Temperaturen	20° C	25° C	30° C	35° C	40° C	45° C	50° C	55° C	60° C
Bei p_H . . . . . In der Zeit	4,4	4,5	4,5	4,6	4,6	4,7	4,8	4,9	5,0
5 Minuten				3,30				6,60	8,00
10 "	1,25		3,00	3,30	3,80	5,00	6,00	7,00	8,00
15 "	1,33	2,00	2,70	3,30	3,70	4,80	5,35	6,60	
20 "		1,70	2,60	3,00	4,00	5,00			
25 "		2,00	2,70	3,20	4,00				
30 "		1,80	2,65	3,00					
35 "		1,70	2,55	3,00					
40 "		1,50	2,55						
45 "	1,41	1,80							
50 "		1,50							
55 "		1,70							
60 "		1,65							
d im Mittel =	1,33	1,75	2,70	3,22	3,90	5,00	5,66	6,70	8,00

Zur Bestimmung des Wertes d für andere p_H verzichteten wir auf die oben genannte limes-Methode, einmal weil sie zu zeitraubend ist und überdies in Fällen, wo die einzelnen Werte d nahe beieinander liegen, auch ungenau wäre. Dementsprechend wurde ein Verfahren angewendet, das sichere Resultate lieferte. Wir beobachteten vor allem die Dextrinierung bei der optimalen p_H, indem wir alle 5 Minuten mit Hilfe der Jodmethode den Verlauf der Reaktion verfolgten, indem eine Reihe bestimmter Farben erhalten wurde, von denen jede einer bestimmten Menge Stärke, die in den 5-Minutenabständen dextriniert worden war, entsprach, d. h. die Farben entsprachen in ihrer Reihenfolge Werten von 5 d, 10 d, 15 d usf. Gleichzeitig wurde auch für alle anderen p_H der Verlauf der Dextrinierung verfolgt, und zwar wurde mit Hilfe der Jodreaktion nach 20 bzw. 30 Minuten geprüft. Die diesbezüglich erhaltenen Farben wurden nun mit den eben vorher, bei optimaler p_H und entsprechender Temperatur ermittelten Farben verglichen, somit mit bekannten Werten d. Auf diesem Wege konnte

die für alle anderen p_H gültigen Werte d gefunden werden, die in Tabelle V zusammengestellt sind.

Tabelle V.

Es wurden die folgenden Werte d gefunden bei Einwirkung von 5 ccm 0,15 proz. Amylase auf 100 ccm 2 proz. Stärkekleister.

Bei Temperat. . p_H	20° C	25° C	30° C	35° C	40° C	45° C	50° C	55° C	60° C
4,0	1,28	1,575	2,46	2,71	3,11	3,30	3,35	2,79	2,00
4,2	1,28	1,64	2,54	3,12	3,63	4,30	4,74	4,50	4,00
4,4	1,33	1,73	2,67	3,16	3,72	4,80	5,04	5,75	6,20—6,40
4,5	1,33	1,75	2,70						
4,6	1,33	1,73	2,70	3,22	3,90	4,83	5,47	6,29	7,40—7,52
4,7						5,00			
4,8	1,33	1,73	2,70	3,21	3,68	5,00	5,665	6,40	7,88
4,9								6,70	
5,0	1,33	1,71	2,70	3,21	3,63	4,80	5,64	6,58	8,00
5,2	1,329	1,706	2,70	3,18	3,57	4,70	5,61	6,55	7,80
5,4	1,329	1,706	2,70	3,17	3,51	4,65	5,50	6,20	7,20
5,6	1,324	1,62	2,65	3,13	3,47	4,60	5,17	5,90	7,00
6,0	1,28	1,57	2,42	2,78	3,34	4,20	4,72	5,25	5,60
6,35	1,16	1,44	2,25	2,36	2,90	3,70	4,18	4,45	5,42
6,7	1,07	1,42	2,16	2,33	2,79	3,40	4,12	4,18	4,80—4,72
Optimum:	4,4	4,5	4,5	4,6	4,6	4,7	4,8	4,9	5,0

In dem Temperaturbereich zwischen 20 und 35° C tritt in obigem die optimale p_H nicht so deutlich hervor wie in den Tabellen I und II. Wiewohl die einzelnen Farbtöne bei der Bestimmung des Wertes d unterschiedlich sind, so wären die betreffenden Differenzen erst an dritter oder vierter Stelle nach dem Komma zu erkennen, weshalb wir diese geringen Unterschiede in obiger Zusammenstellung nur insofern berücksichtigt haben, als wir auf das Optimum p_H hinwiesen.

Die gefundenen Werte d geben uns ein Bild von dem Einfluß der stärkedextrinierenden Wirkung der Amylase. Das ganze wird noch vervollständigt, wenn man die erhaltenen d in entsprechenden Gewichtsmengen x ausdrückt und daraus nach der Gleichung der Reaktionsgeschwindigkeit die Konstante K und K relativ errechnet. K relativ bedeutet die relative Konstante, indem nämlich der höchste Wert von K, der überhaupt erhalten wurde (d. i. bei 60° C und $p_H = 5$) gleich 100 gesetzt und dementsprechend für alle anderen Temperaturen und p_H bestimmt wurde.

Die Untersuchungen über die Konstante der Reaktionsgeschwindigkeit beim Dextrinierungsprozeß der Stärke durch Amylase führen zu den Schlußfolgerungen:

a) Für das Dextrinierungsvermögen der Amylase gibt es keine feste optimale Wasserstoffionenkonzentration; dieselbe ist vielmehr abhängig, insbesondere von der Temperatur.

Tabelle VI.

p_H	20° C		25° C		30° C		35° C	
	$K \cdot 10^4$	K rel.	$K \cdot 10^4$	K rel.	$K \cdot 10^4$	K rel.	$K \cdot 10^4$	K rel.
4,0	2,05	14,70	2,64	19,00	4,15	29,90	4,56	32,80
4,2	2,09	15,00	2,76	19,90	4,29	30,90	5,25	37,80
4,4	**2,23**	**16,04**	2,91	20,90	4,50	32,40	5,33	38,30
4,5			**2,94**	**21,15**	**4,60**	**33,10**		
4,6	2,23	16,04	2,91	20,90	4,60	33,10	**5,45**	**39,20**
4,7								
4,8	2,23	16,04	2,91	20,90	4,60	33,10	5,44	39,10
4,9								
5,0	2,23	16,04	2,88	20,70	4,60	33,10	5,44	39,10
5,2	2,23	16,04	2,87	20,65	4,60	33,10	5,42	39,00
5,4	2,23	16,04	2,87	20,65	4,60	33,10	5,37	38,60
5,6	2,22	15,97	2,72	19,60	4,47	32,20	5,30	38,10
6,0	2,09	15,00	2,64	19,00	4,08	29,30	4,93	35,50
6,35	1,91	13,70	2,42	17,40	3,79	27,20	3,96	28,50
6,7	1,74	12,50	2,38	17,10	3,64	26,20	3,93	28,30

p_H	40° C		45° C		50° C		55° C		60° C	
	$K \cdot 10^4$	K rel.	$K \cdot 10^4$	K rel.	$K \cdot 10^4$	K rel.	$K \cdot 10^4$	K rel.	$K \cdot 10^4$	K rel.
4,0	5,27	37,90	5,64	40,60	5,68	40,90	4,73	34,00	3,37	24,20
4,2	6,14	44,20	7,35	52,90	8,11	58,30	7,67	55,20	6,80	48,90
4,4	6,30	45,35	8,21	59,00	8,64	62,20	9,87	71,00	10,85	78,10
4,5										
4,6	**6,62**	**47,60**	8,26	59,40	9,37	67,40	10,80	77,70	12,90	92,80
4,7			**8,55**	**61,50**						
4,8	6,24	44,90	8,35	60,00	**9,72**	**69,90**	11,00	70,10	13,50	97,10
4,9							**11,56**	**83,20**		
5,0	6,15	44,30	8,21	59,00	9,69	69,70	11,34	81,60	**13,90**	**100,00**
5,2	6,06	43,60	8,04	57,80	9,60	69,10	11,30	81,30	13,50	97,10
5,4	5,94	42,80	7,95	57,20	9,43	67,80	10,67	76,80	12,55	90,30
5,6	5,89	42,40	7,87	56,60	8,85	63,70	10,13	72,90	12,10	87,00
6,0	5,65	40,70	7,18	51,70	8,06	58,00	8,97	64,50	9,60	69,10
6,35	4,91	35,40	6,33	45,50	7,11	51,20	7,58	54,50	8,55	61,50
6,7	4,73	34,00	5,81	41,80	7,00	50,40	7,11	51,20	8,20	59,00

b) Die Geschwindigkeitskonstante innerhalb einer Temperatur ist eine von der Wasserstoffionenkonzentration abhängige Größe; sie ist für jede Temperatur eine andere.

c) Für jede Temperatur kann neben der optimalen Wasserstoffionenkonzentration auch die optimale Zone ermittelt werden, die um so breiter ist, je kleiner die Reaktionsgeschwindigkeit ist, d. h. also in niedrigeren Temperaturen; bei höheren Temperaturen aber ist, mit zunehmender Reaktionsgeschwindigkeit, die optimale Zone enger.

d) In Temperaturen, die unterhalb 35° C liegen, ist die Geschwindigkeitskonstante in der Optimumnähe, besonders nach der alkalischen Seite zu, sehr wenig verschieden von der beim Optimum der p_H ermittelten. Der ungünstige Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration

zu beiden Seiten der optimalen p_H ist um so größer, je höher die Temperatur ist, bei welcher eingewirkt wurde, was sich an der Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit zu erkennen gibt. Diese Verlangsamung tritt oberhalb $p_H = 6$ ein, und zwar in allen Fällen, ebenso unterhalb p_H 4,4 bis 4,2. Innerhalb einer Wasserstoffionenkonzentration von p_H 4,2 (4,4) bis 6,0 dürfte also die allgemeine günstige Zone für die stärkedextrinierende Wirkung der Amylase liegen.

Trägt man die nach Tabelle VI erhaltenen Werte in ein rechtwinkeliges Koordinatensystem derart ein, daß man auf der Abszisse die p_H, auf der Ordinate die dazugehörigen Werte von K relativ aufzeichnet, so erhält man ein Gesamtbild aller Kurven, aus dem sehr deutlich die Abhängigkeit der optimalen p_H von der Temperatur, sowie die der optimalen Zone ersichtlich ist. Die für die einzelnen Temperaturen als optimale p_H gekennzeichneten Punkte liegen fast annähernd auf einer Geraden, deren Richtung von unten—oben nicht senkrecht, sondern mit zunehmender Temperatur von der aciden nach der alkalischen Seite hin verläuft. Einige geringe Abweichungen der optimalen p_H-Punkte von der geraden Verbindungslinie dürften auf Versuchsfehler zurückzuführen sein.

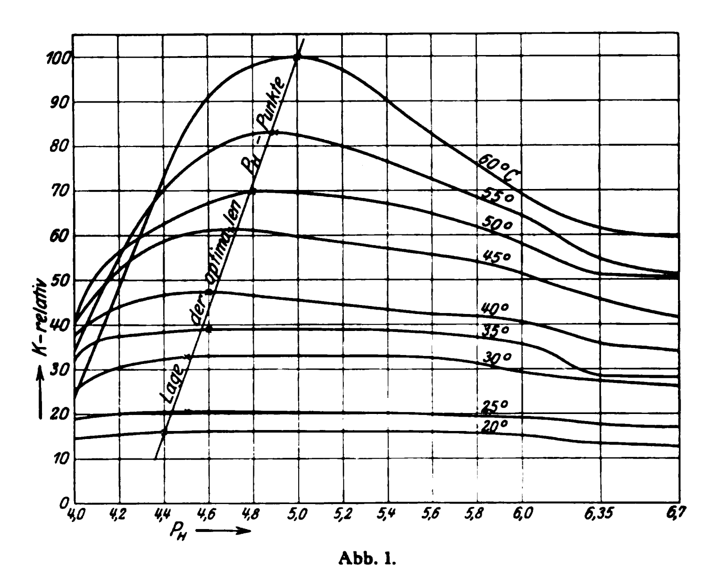


Abb. 1.

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante für die Dextrinierung der Stärkedurch Amylase in wässeriger Lösung ohne Zugabe von Puffersubstanzen.

Es war anzunehmen, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Stärkedextrinierung durch Amylase ohne Zugabe von Puffersubstanzen im Verhältnis zur Reaktionsgeschwindigkeit bei Zugabe von Puffer-

substanzen sich nur insofern unterscheiden würde, als ein Unterschied in der Wasserstoffionenkonzentration vorhanden ist. Im Falle sich dieser Unterschied anders zeigen sollte, müßte diese Differenz auf die Wirkung der Puffersubstanzen selbst zurückzuführen sein. Um dies zu entscheiden, bestimmten wir nach der limes-Methode die Reaktionsgeschwindigkeit bei Gegenwart von Puffersubstanzen sowie bei Abwesenheit von Puffersubstanzen. Die Wasserstoffionenkonzentration des 2proz. Stärkekleisters + Amylaselösung betrug ohne Puffersubstanzen $p_H = 6{,}4$. Tabelle VII zeigt die diesbezüglichen Resultate.

Tabelle VII.

Bei Einwirkung von Amylase auf Stärkekleister bei Gegenwart von Puffersubstanzen wurde gefunden:

Bei einer Temperatur von	20	25	30	35	40	45	50	55	60° C
beim Optimum p_H .	4,4	4,5	4,5	4,6	4,6	4,7	4,8	4,9	5,0
beträgt d_R	1,33	1,75	2,70	3,22	3,90	5,00	5,665	6,70	8,00
beträgt $K_R \cdot 10^4$ . .	2,23	2,94	4,60	5,45	6,62	8,55	9,70	11,60	13,90

Bei Einwirkung von Amylase auf Stärkekleister ohne Puffersubstanzen wurde gefunden:

Bei einer Temperatur von	20	25	30	35	40	45	50	55	60° C
bei einer p_H von . .	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
beträgt d_0	1,12	1,30	2,15	2,38	3,15	4,00	4,77	5,30	6,31
beträgt $K_0 \cdot 10^4$ . .	1,88	2,18	3,66	4,03	5,35	6,84	8,17	9,18	10,96
also $5\,d_0 = 4\,d_R$; $d_R =$	1,40	1,72	2,69	3,00	3,94	5,00	5,96	6,60	7,90

Die letzte Reihe ist berechnet aus dem jedesmaligen Wert von d_0 nach der Gleichung $5\,d_0 = 4\,d_R$ und dient zum Vergleich mit den im oberen Teile der Tabelle VII erhaltenen Werten d_R.

Aus Tabelle VII ersehen wir, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in wässeriger Lösung bei Abwesenheit von Puffersubstanzen im Vergleich mit der Reaktionsgeschwindigkeit in gepufferter Lösung beim Optimum p_H um etwa 17 bis 21 Proz. abhängig von der Temperatur langsamer verläuft.

Gleichzeitig ergibt sich, wie aus den Reaktionskonstanten ersichtlich, die sowohl für die bei $p_H = 6{,}4$ verpufferten Lösungen als auch für ungepufferte Lösungen von derselben Wasserstoffionenkonzentration ermittelt wurden (K_R und K_0), daß die Puffersubstanzen als solche eine sichtliche, unmittelbare Wirkung ausüben, die von 30° C aufwärts als schon ungünstig zu nennen ist. Oberhalb 30° C finden wir, wie aus Tabelle VIII ersichtlich, daß die Werte K_0 zahlenmäßig größer sind als die zu derselben p_H zugehörigen Werte K_R.

Tabelle VIII.

Temperatur: . .	20	25	30	35	40	45	50	55	60° C
Bei p_H = 6,4 ohne Puffersubstanz beträgt									
$K_0 \cdot 10^4$ . . . =	1,88	2,18	3,66	4,03	5,35	6,84	8,17	9,18	10,96
Mit Puffersubstanz bei p_H = 5,6 ist									
$K_R \cdot 10^4$ . . =	2,22	2,74	4,47	5,30	5,89	7,87	8,85	10,13	12,10
bei p_H = 6,0 =	2,09	2,64	4,08	4,93	5,65	7,18	8,06	8,97	9,60
bei p_H = 6,35 =	1,91	2,42	3,79	3,96	4,91	6,33	7,11	7,58	8,55
bei p_H = 6,7 =	1,74	2,38	3,64	3,93	4,73	5,81	7,00	7,11	8,20

Das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten.

Das Verhältnis der Konstanten wurde von uns für Temperaturintervalle von 10° C berechnet. Wie aus nachstehender Tabelle ersichtlich, nimmt das Verhältnis mit steigender Temperatur ab. Ähnliche Zahlen findet man in der Literatur für das Verzuckerungsvermögen der Amylase.

Temperaturen	$\frac{K_2}{K_1}$ bei optim. p_H	$\frac{K_2}{K_1}$ für ungepuff. Lösung.
20—30° C	2,00	1,92
25—35	1,84	1,83
35—45	1,55	1,68
40—50	1,45	1,50
45—55	1,34	1,33
50—60	1,41	1,32

Der Temperaturkoeffizient.

Nach einer von *Arrhenius* aufgestellten Gleichung läßt sich der Temperaturkoeffizient A wie folgt berechnen;

$$A = \frac{\log\left(\frac{K_2}{K_1}\right) \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot 2}{M\,(T_2 - T_1)}.$$

Für Intervalle von 10° C ergaben sich, indem wir die Reaktionsgeschwindigkeit bei der optimalen p_H für eine Zahlenreihe, sowie für die zweite Reihe die Reaktionsgeschwindigkeit in wässeriger, ungepufferter Lösung zugrunde legten, folgende beiden, ganz gut übereinstimmenden Reihen:

Temperaturen	A bei optim. p_H	A für ungepuff. Lösungen
20—30° C	12 860	11 580
25—35	11 192	11 292
35—45	8 584	10 162
40—50	7 512	8 200
45—55	6 100	5 948
50—60	7 390	6 000

Wie die obigen Zahlen zeigen, wird der für Intervalle von 10° C berechnete *Arrhenius*sche Temperaturkoeffizient für das Dextrinierungsvermögen der Amylase mit steigender Temperatur kleiner.

In dieser Hinsicht finden wir eine Analogie mit den von *Ernström*[1]), *Lüers* und *Wasmund*[2]) angegebenen, für das Verzuckerungsvermögen der Amylase berechneten Zahlen, mit denen sie zahlenmäßig fast übereinstimmen. Für das Dextrinierungsvermögen wurde der Koeffizient von *Sjöberg*[3]) bestimmt, doch stimmen seine Zahlen mit den unsrigen nicht überein. *Sjöberg* findet sowohl das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten $\left(\frac{K_2}{K_1}\right)$ als auch den Temperaturkoeffizienten A für verschiedene Temperaturintervalle konstant, was offenbar darauf zurückzuführen ist, daß *Sjöberg* auf einem verhältnismäßig geringen Versuchsmaterial basiert, außerdem in seinen Versuchen die niedrigeren Temperaturen berücksichtigte, wobei, in Anbetracht der analytischen Schwierigkeiten, die Unterschiede nur schwer festzustellen sind.

Die Inaktivierung der Amylase.

Zwecks Feststellung der Inaktivierung beschickten wir eine Anzahl Reagenzgläser mit 0,15proz. Amylaselösung, die mit einer bestimmten Menge Acetatpuffergemisch versetzt wurde, so daß die Wasserstoffionenkonzentrationen von $p_H = 5$, 5,5, 6,0 und 6,4 erhalten wurden; letztere ergab sich als p_H der wässerigen Lösung, ohne Zusatz von Puffergemisch also. Als Versuchstemperaturen wählten wir 35, 50 60 und 65° C. Die Zeit der Inaktivierung wurde auf ½ und 1 Stunde festgesetzt. Nach dem Herausnehmen aus dem Wasserbad wurde sofort abgekühlt und mit der nunmehr inaktivierten Amylase auf 2proz. Stärkekleister bei 30° C und der dieser Temperatur entsprechenden optimalen $p_H = 4{,}6$ eingewirkt. Die dextrinierende Kraft der inaktivierten Amylase wurde wie oben durch Ermittlung von d, durch Auffinden des limes bestimmt. Die Inaktivierung in den einzelnen Temperaturen und Wasserstoffionenkonzentrationen wird in folgender Tabelle veranschaulicht.

Die Verlangsamung der Dextrinierung betrug bei Inaktivierung der Amylase in den Temperaturen:

Nach ½ Stunde

Bei p_H	35° C Proz.	50° C Proz.	60° C Proz.	65° C Proz.
5,0	2,0	19	31,7	62,5
5,5	1,2	15	25,0	48,0
6,0	1,8	19	27,0	41,5
6,4	3,5	19	33,0	35,0

[1]) l. c.
[2]) l. c.
[3]) *K. Sjöberg*, diese Zeitschr. **133**, 218, 1922.

Nach 1 Stunde

Bei p_H	35° C Proz.	50° C Proz.	60° C Proz.	65° C Proz.
5,0	5,0	21	46,7	100,0
5,5	2,0	16	32,0	59,0
6,0	4,0	20	36,7	44,0
6,4	7,0	22	38,0	38,5

Die Zahlen zeigen, daß die Inaktivierung oberhalb 30° C beginnt. Bei 35° C ist sie noch unbedeutend, übereinstimmend also mit den von *Sjöberg* gemachten Beobachtungen. Mit steigender Temperatur wird die Inaktivierung der Amylase größer, jedoch nicht in dem Grade, wie es *Sjöberg* findet, daß nämlich die dextrinierende Kraft der bei 55° C inaktivierten Amylase gleich Null ist. Unsere Untersuchungen konnten derartiges nicht feststellen; erst bei 65° C bei $p_H = 5$ finden wir eine gänzliche Inaktivierung der Amylase. In derselben Temperatur finden wir bei $p_H = 6$ bis 6,4 noch über 50 Proz. nicht inaktivierter Amylase. Die Inaktivierung hängt ab von der Temperatur, der Inaktivierungszeit und der p_H. In Temperaturen unter 60° C liegt die größte Stabilität zwischen p_H 5,5 und 6; bei 65° C aber verschiebt sich dieselbe von $p_H = 6$ auf 6,4. Die Stabilität verschiebt sich also von p_H 5,5 bis 6,4.

Es dürfte hierbei noch folgendes hervorzuheben sein. *v. Euler* gibt an, daß die Inaktivierung beim Optimum p_H untersucht werden muß, einer nach seinem Dafürhalten festen Größe. Da jedoch, wie unsere Untersuchungen zeigen, es eine optimale p_H als feste Größe nicht gibt, so ist bei Inaktivierungsbestimmungen anzugeben, welche p_H als Optimum bei der betreffenden Temperatur angenommen war, denn abhängig von dieser p_H kann die Inaktivierung sich verschieden groß zeigen, eine Tatsache, durch die auch offenbar der Unterschied zwischen unseren Zahlen und den von anderen Autoren angegebenen bedingt wird.

Zusammenfassung.

Die Untersuchungen über die Depolymerisation (Dextrinierung) der Stärke durch gereinigte, aus Weizenmalz erhaltene Amylase führen uns zu den Schlußfolgerungen:

1. Eine feste optimale Wasserstoffionenkonzentration für das Dextrinierungsvermögen der Amylase gibt es nicht. Die optimale p_H ist abhängig von verschiedenen Bedingungen, besonders von der Temperatur der Einwirkung der Amylase, ferner von dem Massenwirkungsgesetz, von der Schutzwirkung der Stärke und den Puffersubstanzen als solchen. Bei jeglicher Änderung der Versuchsbedingungen, besonders der Temperatur, zeigt sich eine andere p_H als günstigste; so verschiebt sich bei Temperatursteigerung von 20° C an bis 75° C

die optimale p_H von 4,4 bis auf 5,4. Alle Bedingungen, die auf die Amylase ungünstig einwirken, wie höhere Temperatur, Konzentrationserniedrigung der aufeinander wirkenden Massen (Stärke und Amylase), wie die dadurch verminderte Schutzwirkung des Stärkekleisters, verschieben die optimale p_H in alkalischer Richtung, wie andererseits die die amylolytische Wirkung günstig beeinflussenden Agenzien die optimale p_H in acider Richtung verschieben. Aus diesem Grunde also hat die Angabe einer optimalen p_H für das Dextrinierungsvermögen der Amylase, wie wahrscheinlich auch für andere Enzyme, nur dann seinen Zweck und seine Richtigkeit, wenn gleichzeitig die Versuchsbedingungen angegeben werden. Damit werden auch die scheinbaren Unstimmigkeiten bezüglich verschiedener optimaler p_H klar, die für die amylolytische Wirkung von verschiedenen Autoren angegeben werden.

2. Ähnlich verhält es sich mit der optimalen Zone der Wasserstoffionenkonzentration für die Wirkung der Amylase, die ebenfalls keine feste Größe ist. In niedrigeren Temperaturen bis 40° C ist die günstige Zone groß, breitet sich zu beiden Seiten der optimalen p_H der betreffenden Temperatur aus, geht also sowohl in alkalischer als auch in acider Richtung. Mit steigender Temperatur verengt sich die günstige Zone, wobei sie sich gleichzeitig immer mehr in alkalischer Richtung hin verschiebt, um schließlich bei 60° C in ein scharfes Optimum der p_H überzugehen. In diesen Temperaturen ist schon eine verhältnismäßig geringe Änderung der p_H auf die Wirkung der Amylase von großem Einfluß, was in den niedrigeren Temperaturen nicht der Fall ist.

3. Die Konstante der Reaktionsgeschwindigkeit K ist für jede Temperatur abhängig von der p_H, wie aus dem Kurvenbild deutlich hervorgeht, das aus den erhaltenen Werten K relativ konstruiert ist.

4. Die Acetatpuffergemische beschleunigen abhängig von der Temperatur die Dextrinierungsgeschwindigkeit günstigstenfalls um etwa 21 bis 26 Proz. im Vergleich zu wässerigen Lösungen ohne Puffersubstanzen.

5. Das Verhältnis der Konstanten $\left(\frac{K_2}{K_1}\right)$ und die Temperaturkoeffizienten (A) für 10grädige Temperaturabstände nehmen mit steigender Temperatur ab und nähern sich zahlenmäßig sehr den für das Verzuckerungsvermögen gefundenen Werten.

6. Die Inaktivierung der Amylase beginnt oberhalb 30° C, und abhängig von der p_H wird die Amylase oberhalb 60 bzw. 65° C im Sinne *v. Eulers* gänzlich inaktiviert, d. h. also in bedeutend höherer als bisher angenommener Temperatur. Da es keine feste optimale p_H gibt, so muß die Inaktivierung im Sinne *v. Eulers* beim Optimum der p_H der betreffenden Temperatur untersucht werden, welchen p_H-Wert man der Genauigkeit wegen immer angeben muß.

Über chinin- und atoxylfeste Lipasen in innersekretorischen Organen.

Von

Ernst Herzfeld und **Werner Engel.**

(Aus der III. medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 1. Mai 1925.)

Der Nachweis von Lipasen in den verschiedenen Geweben, allerdings mit anderen Methoden als den jetzt üblichen, war bereits vor längerer Zeit geführt worden.

So konnten unter anderen *A. Pagenstecher* (1) in Milz, Leber, Lunge, Niere, *Loeb* und *Guttmann* (2) in den Ovarien und *Bütow* (3) in der Hypophyse lipolytische Fermente nachweisen. Aber erst durch die zahlreichen Untersuchungen von *Rona* und seinen Mitarbeitern wurde es ermöglicht, die einzelnen Lipasen zu differenzieren, und zwar durch Feststellung ihrer Festigkeit gegenüber einzelnen Giften. Die vornehmlich zur Verwendung gelangenden Gifte waren Chinin und Atoxyl. Eine Reihe von Organen ist bereits auf das Verhalten ihrer Lipasen diesen Giften gegenüber geprüft worden. Nach *Rona* und *Pavlovič* (4) ist die im Pankreas vorhandene Lipase gegen Atoxyl ganz unempfindlich, während sie durch Chinin stark angegriffen wird; nach den gleichen Autoren (5) zeigt die Leberlipase genau das umgekehrte Verhalten. Ebenso wie die Leberlipase verhält sich die Nierenlipase (*Rona* und *Haas*) (6) und die Lungenlipase (*Krömeke*) (7). Während beim Menschen die Lipase des Serums, im Gegensatz zu der der Erythrocyten (*Simon*) (8), normalerweise keine Giftfestigkeit zeigt, sollen nach *Rona*, *Petow* und *Schreiber* (9) und *Petow* und *Schreiber* (10) bei Leber- und Nierenerkrankungen chininresistente Lipasen im Serum auftreten. Trotz ihres konstanten Vorkommens bei Lebererkrankungen ist der Nachweis chininresistenter Lipasen nach *Simon* (11) wegen ihres gelegentlichen Vorkommens auch bei anderen Erkrankungen zurzeit wenigstens für die klinische Diagnostik noch nicht verwertbar. Außerdem scheinen, was bisher gleichfalls noch nicht genügend gewürdigt ist, auch andere Faktoren, z. B. nach *Prewitt* (12) das Pilocarpin, die Abgabe von Organlipasen in das Blut zu beeinflussen. Gerade bei Organen, bei denen bestimmte hormonale Stoffe in das Blut abgegeben werden, erschien es uns notwendig, festzustellen, ob Veränderungen der innersekretorischen Tätigkeit nicht auch mit Veränderungen der Fermentabgabe ins Blut einhergehen. Ehe man aber an diese und andere Fragen überhaupt herangeht, muß man zunächst über die Art der Lipasen in den einzelnen Organen genau unterrichtet sein. Von den Organlipasen des innersekretorischen Systems wissen wir aber

Näheres erst über die des Pankreas (*Rona* und *Pavlović*) (4) und der Schilddrüse (*Herzfeld* und *Engel*) (13). Wir haben es daher im folgenden unternommen, Untersuchungen über die Giftfestigkeit der in Nebenniere, Hoden, Ovarium, Corpus luteum, Thymus und Hyphophyse befindlichen Lipasen anzustellen.

Die Wirksamkeit der Lipasen dieser innersekretorischen Organe wurde nach der stalagmometrischen Methode von *Rona* und *Michaelis* bestimmt. In jedem Versuch kamen zu 1 ccm des zu untersuchenden Organextrakts 3 ccm einer Pufferlösung und 1 ccm des Giftes. Nachdem dieses 30 Minuten lang gewirkt hatte, wurden 50 ccm Tributyrinlösung zugesetzt. Der Einfluß der Lipasen auf die Oberflächenspannung der Tributyrinlösung wurde durch Bestimmung der Tropfenzahl am Stalagmometer in gleichmäßigen Zeitabständen festgestellt. Bezüglich der Zusammensetzung der von uns angewandten Puffer- und Tributyrinlösungen verweisen wir auf unsere Arbeit über die Schilddrüsenlipasen (13).

Ebenso wie in den Versuchen an Schilddrüsen haben wir auch die Lipasen der hier untersuchten innersekretorischen Organe auf ihre Resistenz gegen Chinin und Atoxyl geprüft. Diese Gifte wurden, falls nichts anderes angegeben, in 0,2 proz. Lösung verwandt. In jedem Falle wurden Kontrollversuche angestellt, die statt der Gifte die gleiche Menge Aqua dest. enthielten.

Die Organextrakte wurden, wie in der Arbeit über Schilddrüsen lipasen schon genauer ausgeführt worden ist, durch Filtrieren eines Organbreies hergestellt und erhielten einen Konservierungszusatz von 2 Proz. Chloroform.

Da unsere Versuchsreihen im allgemeinen zu gleichartigen Resultaten führten, haben wir im folgenden nur einzelne Beispiele angeführt. Es sollen zunächst die Resultate von Versuchen an Nebennieren mitgeteilt werden.

Tabelle I.

Extrakt aus Rindernebennieren.

Tributyrin: 181 Tropfen. Aqua dest.: 125 Tropfen. Protokoll Nr. 9.

Minuten	Chinin	Atoxyl	Kontrolle
3	168	168	167
20	165	166	164
40	163	161	158
60	153	154	149

Die starke Abnahme der Tropfenzahl in allen drei Fällen, die das Zeichen einer Erhöhung der Oberflächenspannung ist, zeigt, daß die Nebennieren des Rindes Lipasen enthalten, die gegen Chinin und auch gegen Atoxyl resistent sind.

Ebenso verhielten sich Extrakte aus Nebennieren des Hammels.

Tabelle II.

Extrakt aus Hammelnebennieren.

Tributyrin: 158 Tropfen. Aqua dest.: 121 Tropfen. Protokoll Nr. 7a.

Minuten	Chinin 0,2 Proz.	Chinin 2 Proz.	Atoxyl 0,2 Proz.	Atoxyl 2 Proz.	Kontrolle
3	156	154	153	155	153
20	127	138	137	145	131
40	126	133	130	137	126
60	122	132	128	129	125
80	121	132	127	126	126

In diesem Versuch wurden nicht nur die Giftkonzentrationen von 0,2 Proz. verwandt, sondern daneben je eine Vergleichsprobe mit der zehnfach stärkeren Konzentration angestellt. Die 2 Proz. Chininlösung hatte im Gegensatz zu der entsprechenden Atoxyllösung einen leicht hemmenden Einfluß auf die Fermentwirkung. Die Differenzen der Tropfenzahlen nach 3 und nach 80 Minuten beweisen aber, daß auch in den Nebennieren des Hammels chinin- und atoxylresistente Lipasen vorhanden sind.

Im folgenden sind die Resultate einer Anzahl von Versuchen an Extrakten aus Stierhoden und Rinderovarien aufgeführt.

Tabelle III.

Extrakt aus Stierhoden.

Tributyrin: 166 Tropfen. Aqua dest.: 122 Tropfen. Protokoll Nr. 13.

Minuten	Chinin	Atoxyl	Kontrolle
3	160	164	160
30	155	156	156
60	150	152	155
90	149	146	141

Tabelle IV.

Extrakt aus Stierhoden.

Tributyrin: 124 Tropfen. Aqua dest.: 97 Tropfen. Protokoll Nr. 20.

Minuten	Chinin	Atoxyl	Kontrolle
3	119	118	119
30	114	116	116
60	114	114	113
90	111	111	110

Tabelle V.

Extrakt aus Rinderovarien.

Tributyrin: 126 Tropfen. Aqua dest.: 98 Tropfen. Protokoll Nr. 15.

Minuten	Chinin	Atoxyl	Kontrolle
3	121	120	120
30	116	117	115
60	109	112	108
90	100	107	99

Tabelle VI.

Extrakt aus Rinderovarien.

Tributyrin: 124 Tropfen. Aqua dest.: 97 Tropfen. Protokoll Nr. 19.

Minuten	Chinin	Atoxyl	Kontrolle
3	120	119	118
30	115	115	114
60	111	112	107
90	105	108	100

Sowohl die Hoden- als auch die Ovarienextrakte enthalten demnach chinin- und atoxylfeste Lipasen. Es ist aber bei diesen Organen ein wenn auch geringer Unterschied in ihrem Verhalten gegen Chinin einerseits und Atoxyl andererseits festzustellen.

Wie sich aus Tabelle III und IV ergibt, erwiesen sich die Hodenlipasen gegen Chinin zum Teil etwas weniger resistent als gegen Atoxyl, teils blieben sie durch beide Gifte in gleicher Weise unverändert. Anders verhielten sich dagegen die Ovarienextrakte. Die Tabellen V und VI zeigen, daß die Lipasen der Ovarien gegen Atoxyl etwas weniger resistent sind als gegen Chinin.

Bei der Herstellung der Ovarienextrakte waren vorher die Corpora lutea entfernt und aus diesen besondere Extrakte hergestellt worden.

Tabelle VII.

Extrakt aus der Corpus luteum des Rindes.

Tributyrin: 124 Tropfen. Aqua dest.: 97 Tropfen. Protokoll Nr. 21.

Minuten	Chinin	Atoxyl	Kontrolle
3	117	117	117
30	113	114	114
60	109	110	110
90	105	107	107

Bei der Untersuchung dieser Extrakte ergab sich, daß auch das Corpus luteum des Rindes Lipasen enthält, die sowohl gegen Chinin als auch gegen Atoxyl resistent sind.

In Extrakten, die in gleicher Weise wie bei den bisher beschriebenen Organen aus der Thymus des Kalbes hergestellt wurden, konnten ebenfalls chinin- und atoxylresistente Lipasen nachgewiesen werden.

Tabelle VIII.

Extrakt aus dem Thymus des Kalbes.

Tributyrin: 152 Tropfen. Aqua dest.: 124 Tropfen. Protokoll Nr. 23.

Minuten	Chinin	Atoxyl	Kontrolle
3	150	147	147
30	138	137	137
60	132	127	130
90	130	126	128

Im folgenden sei auch über Versuche an Kalbshypophysen berichtet. Bei diesen Organen reichte die Verarbeitung in der Fleischmühle nicht aus, um einen geeigneten Organbrei zu erhalten. Aus diesem Grunde wurden die Hypophysen, nachdem sie gereinigt, gespült und zerkleinert waren, mit reinem Sand zusammen im Mörser zu einem Brei verrieben und aus diesem der Extrakt hergestellt.

Tabelle IX.

Extrakte aus Kalbshypophysen.

Tributyrin: 133 Tropfen. Aqua dest.: 86 Tropfen. Protokoll Nr. 33.

Minuten	Chinin	Atoxyl	Kontrolle
3	129	132	129
30	118	125	116
60	114	115	103
90	98	106	98

Bei der Untersuchung zeigten die Hypophysen sehr wirksame Lipasen, die auch gegen Chinin und Atoxyl resistent waren. Während jedoch der Chininzusatz ganz ohne Wirkung war, zeigte sich auf Atoxyl eine geringfügige Hemmung.

Um die Frage zu beantworten, ob die untersuchten Lipasen wirklich aus den Organzellen stammten oder vielleicht aus den interzellulären Gewebsflüssigkeiten mit in die Extrakte hineingekommen waren, wurden zum Vergleich Versuche mit dem Serum der entsprechenden Tierart angestellt.

Tabelle X.

Versuch mit Hammelserum.

Tributyrin: 127 Tropfen. Aqua dest.: 86 Tropfen. Protokoll Nr. 29.

Minuten	Chinin	Atoxyl	Kontrolle
3	125	125	124
30	124	122	123
60	121	122	121
90	120	121	119

Tabelle XI.

Versuch mit Rinderserum.

Tributyrin: 120 Tropfen. Aqua dest.: 90 Tropfen. Protokoll Nr. 22.

Minuten	Chinin	Atoxyl	Kontrolle
3	117	117	117
30	115	116	117
60	114	114	114
90	114	114	113

Wie sich aus Tabelle X und XI ergibt, war unter den gleichen Bedingungen, unter denen die Organextrakte meist sehr stark lipolytisch

wirksam waren, die Wirkung der Serumlipasen nur gering. Demnach muß die in den Organversuchen festgestellte lipolytische Wirkung auf die Zellfermente selbst zurückgeführt werden.

Die im vorstehenden mitgeteilten Untersuchungen über die Lipasen der innersekretorischen Organe scheinen uns eine geeignete Grundlage zu bieten für weitere Feststellungen über das Verhalten der Fermente dieser Organe auch unter pathologischen Bedingungen.

Zusammenfassung.

In Organextrakten aus Nebenniere, Hoden, Ovarium, Corpus luteum, Thymus und Hypophyse konnten Lipasen nachgewiesen werden.

Die Lipasen dieser sämtlichen Organe erwiesen sich resistent gegen Chinin und Atoxyl.

In bezug auf den Grad der Resistenz ergaben sich nur geringe Unterschiede.

Ein gewisser Gegensatz besteht im Verhalten der Lipasen von Hoden und Ovarien. Die Hodenlipasen erwiesen sich zum Teil weniger resistent gegen Chinin als gegen Atoxyl, die Lipasen der Ovarien weniger resistent gegen Atoxyl als gegen Chinin.

Literatur.

1) Diese Zeitschr. **18**, 1909. — 2) Ebendaselbst **41**, 1912. — 3) Ebendaselbst **54**, 1913. — 4) Ebendaselbst **134**, 1923. — 5) Ebendaselbst **130**, 1922. — 6) Ebendaselbst **141**, 1923. — 7) Klin. Wochenschr. **34**, 1923. — 8) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **39**, 1924. — 9) Klin. Wochenschr. **48**, 1922. — 10) Ebendaselbst **27**, 1923. — 11) Deutsch. med. Wochenschr. **16**, 1923. — 12) Amer. Journ. of Physiol. **65**, 1923; zitiert nach Kongr.-Zentralbl. f. inn. Med. **32**. — 13) Diese Zeitschr. **151**, 1924.

Eine einfache Methode zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins.

Von

Ludwig Surányi und Andreas Korényi.

(Aus dem bakteriologischen Institut und aus dem pathologisch-anatomischen Institut Nr. II der königl. ungar. Pázmány-Péter-Universität zu Budapest.)

(Eingegangen am 5. Mai 1925.)

Zur Ausarbeitung der unten näher beschriebenen Methode regten uns Versuche an, welche die Klärung der Rolle des Cholesterins beim Entstehen des Kropfes bezweckten. Zu diesem Zwecke behandelte der eine von uns mehrere Kaninchen verschiedentlich mit Cholesterin. Vor, während und nach Abschluß der Cholesterinbehandlung wurden Blutcholesterinbestimmungen durchgeführt. Solange nur wenige Bestimmungen durchzuführen waren, wurde mit der präzisen *Windaus*schen Methode gearbeitet. Als aber zahlreiche Bestimmungen gleichzeitig fällig wurden, mußte die erwähnte Methode, hauptsächlich weil sie zu viel Zeit beansprucht, mit der *Autenrieth-Funk*schen Methode, welche bekanntlich eine kolorimetrische Anwendung der *Liebermann-Burkhardt*schen ist, vertauscht werden. Daß die kolorimetrischen Methoden keine absoluten Werte geben, ist bekannt, jedoch sind die Resultate im allgemeinen für praktische Zwecke entsprechend wie z. B. bei einer Bestimmung von Hämoglobin, Zucker usw. Bei dem Cholesterinspiegel des Blutes liegen aber normale und pathologische Werte dicht nebeneinander, und so tritt hier der Versuchsfehler, die Subjektivität beim Vergleichen zweier Farbentöne, um so mehr in den Vordergrund. Es kommen auch Farbennuancen vor, welche man mit der Farbe des Keiles überhaupt nicht vergleichen kann.

Die obenerwähnten Versuche mußten aus äußeren Gründen abgebrochen werden. Da die erste erwähnte Methode zu Massenuntersuchungen ungeeignet, die andere aber für feinere Bestimmungen unbrauchbar ist, wurde die unerwünschte Arbeitspause zur Erprobung einer leicht durchführbaren und dennoch zahlenmäßige Werte liefernden Methode benutzt.

Der Anhaltspunkt unserer Versuche war die bekannte Tatsache, daß Cholesterin die lytische Wirkung des Saponins gegen rote Blutkörperchen aufzuheben vermag. Es wurde die kleinste noch lösende

Menge einer Saponinlösung gegen 1 ccm 5proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung in 2,5 ccm Gesamtflüssigkeitsmenge bestimmt. Nun wurde in zwei Reihen von Röhrchen die eben lösende Saponinmenge abgemessen und zu der einen Reihe von einer 0,5proz. alkoholischen Cholesterinlösung von 0,05 ccm angefangen, in jedes folgende Röhrchen um 0,05 ccm mehr gegeben. Die zweite Reihe wurde ganz analog mit einer Chloroformlösung von Cholesterin versetzt. Die Röhrchen wurden dann mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1,5 ccm aufgefüllt und mit 1 ccm 5proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung beschickt. Die Unbrauchbarkeit der Chloroformlösungen konnten wir alsbald feststellen, da trotz Vorhandenseins des Cholesterins überall Lyse bzw. Lyse und ein bräunlichroter Niederschlag, bestehend aus Cholesterin und Blutfarbstoff, entstand. Der Versuch wurde mit reinem Chloroform ohne Saponin wiederholt und so wurde festgestellt, daß auch durch Chloroform allein, wie bekannt, die Lyse der roten Blutkörperchen zustande kommt. Aber auch die Alkoholreihe gab keine befriedigenden Resultate. Die ersten Röhrchen zeigten zwar Andeutungen von quantitativen Differenzen, in den weiteren aber wurde wieder die oben beschriebene Fällung beobachtet. Es war naheliegend, für diesen Niederschlag die mit der steigenden Menge der Cholesterinlösung parallel steigende Alkoholmenge zu beschuldigen. Um die Wirkung größerer Alkoholmengen auszuschalten, wurden von 0,05 bis 0,5 Proz. zehn Cholesterinlösungen hergestellt. Bei den so angestellten Versuchen war die Alkoholmenge konstant 0,1 ccm, die Cholesterinmenge wurde dadurch erhöht, daß zu jedem folgenden Röhrchen eine konzentriertere Lösung gegeben wurde. Die Versuchsanordnung erfuhr sonst keine Änderung. Die Resultate wurden nach $1/2$, 1, 2, 16 und 24 Stunden nach dem Ansetzen abgelesen; die wiederholt angelegten Versuche ergaben keine eindeutigen Resultate. Einigemal konnten wir schöne Differenzen zwischen kompletter Lyse und kompletter Hemmung parallelgehend mit der steigenden Menge des Cholesterins verzeichnen, aber ein konstanter Zusammenhang zwischen der Menge des Cholesterins und der durch dasselbe verursachten Hemmung der Saponinhämolyse konnten wir nicht feststellen, obwohl den Ingredienzien die größte Aufmerksamkeit gewidmet wurde, so stammten die Blutkörperchen von demselben Hammel und die Bereitung der Aufschwemmung geschah immer in derselben Weise usw.

Weitere Versuche wurden ohne Blutkörperchen ausgeführt, und die Auffüllung mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1,5 ccm wurde auch fortgelassen; es wurde nur das Aufeinanderwirken der Saponin- und Cholesterinlösung beobachtet. Da zeigte sich in jedem Röhrchen mehr oder weniger ein weißflockiger Niederschlag. Auch die Verwendung konzentrierterer Saponinlösungen verursachte keine Änderung, und

so ersetzten wir die Saponinlösung zuerst durch physiologische Kochsalzlösung, später durch destilliertes Wasser. In einer Reihe von Versuchsröhrchen maßen wir je 0,1 ccm destillierten Wassers ab und fügten je 0,1 ccm Cholesterinlösung verschiedener Konzentration hinzu. Nun konnten wir sehen, daß 0,1 ccm einer 0,05proz. Lösung mit 0,1 ccm destilliertem Wasser leichte Opaleszenz und wenig Niederschlag bildete, eine 0,5proz. Lösung dagegen einen mächtigen Niederschlag verursachte. Die Menge des Niederschlags bei Verwendung anderer Lösungen zwischen den erwähnten zwei extremen Konzentrationen war der Menge des Cholesterins entsprechend. Selbstredend war eine Abschätzung der Cholesterinkonzentration aus der Menge des gebildeten Niederschlags mit unbewaffnetem Auge unmöglich. Da uns kein Nephelometer zur Verfügung stand, suchten wir nach einem anderen Maßstab.

In einem Röhrchen wurden 0,1 ccm destillierten Wassers und 0,1 ccm einer 0,05proz. alkoholischen Cholesterinlösung abgemessen, worauf ein Niederschlag entstand. Nun wurden weitere Mengen letzterer Cholesterinlösung zugefügt, um eine ebensolche Menge des Niederschlags zu bekommen, wie wir sie bei der Vermengung von 0,1 ccm destillierten Wassers und 0,1 ccm 0,5proz. Cholesterinlösung erhalten hatten. Wir hofften nämlich aus der hierzu nötigen Menge bei verschieden dichten Cholesterinlösungen auf die Konzentration derselben Aufschlüsse zu bekommen. Auf diese Weise hat sich anfangs tatsächlich die Menge des Niederschlags vermehrt, mit steigender Menge der Cholesterinlösung jedoch hat sich der Niederschlag mehr und mehr gelöst, bis nur leichte Opaleszenz zurückblieb, welche nach Zugabe der nächsten 0,01 ccm Cholesterinlösung gänzlich verschwand und die Flüssigkeitsmenge kristallklar wurde. Diese Erscheinung erklärt sich durch die Löslichkeit des Cholesterins in Alkohol. Wird destilliertes Wasser und die alkoholische Cholesterinlösung in gleichem Verhältnis zusammengebracht, so fällt das Cholesterin aus; durch Zugabe weiterer Mengen der Cholesterinlösung wird die relative Menge des Wassers verringert. Wird die Menge des Wassers im Verhältnis zu dem anwesenden Alkohol verschwindend klein, so löst sich das vorerst ausgefällte Cholesterin allmählich.

Nun haben wir mit höher konzentrierten Lösungen den vorherigen Versuch wiederholt und fanden einen regelmäßigen Zusammenhang zwischen Konzentration der Cholesterinlösung einerseits und jener Menge der Lösung andererseits, worauf der anfangs entstandene Niederschlag verschwindet. Nun benötigten wir eine längere Reihe von Cholesterin-Alkohollösungen verschiedener Konzentration, um die oben beschriebenen Versuche auf breiter Basis wiederholen und die Resultate tabellarisch zusammenstellen zu können. Diese Lösungen

wurden uns durch die Aktiengesellschaft für chemische Industrie ‚Tres" bereitwilligst zur Verfügung gestellt. Die Resultate der mit diesen Lösungen angestellten Versuche sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefaßt.

Dest. Wasser ccm	Alkoholische Cholesterinlösung Proz.	Der anfangs gebildete Niederschlag löst sich bei ccm	Dest. Wasser ccm	Alkoholische Cholesterinlösung Proz.	Der anfangs gebildete Niederschlag löst sich bei ccm
0,1	0,05	0,25	0,1	0,16	0,47
0,1	0,06	0,27	0,1	0,17	0,49
0,1	0,07	0,29	0,1	0,18	0,51
0,1	0,08	0,31	0,1	0,19	0,53
0,1	0,09	0,33	0,1	0,20	0,55
0,1	0,10	0,35	0,1	0,25	0,65
0,1	0,11	0,37	0,1	0,30	0,75
0,1	0,12	0,39	0,1	0,35	0,85
0,1	0,13	0,41	0,1	0,40	0,95
0,1	0,14	0,43	0,1	0,45	1,05
0,1	0,15	0,45	0,1	0,50	1,15

Es wird nachdrücklich betont, daß die Qualität des Alkohols ausschlaggebend ist. Die obigen Zahlen beziehen sich auf mit 96proz. Alkohol hergestellte Lösungen. Der Zustand der Glasgeräte ist auch von größter Wichtigkeit. Nur absolut reine Geräte dürfen verwendet werden, da sonst die kleinste Verunreinigung das Beobachten der Auflösung des Niederschlags sehr erschwert, manchmal sogar gänzlich unmöglich macht. Um solche Übelstände vermeiden zu können, ist es ratsam, die Geräte 24 Stunden in fließendem Wasser zu waschen, dann mit Chloroform, Alkohol und zuletzt mit Äther auszuspülen und an einem staubfreien Orte zu trocknen.

Im Besitz der tabellarisch zusammengestellten Daten haben wir mit Blut Cholesterinbestimmungen durchgeführt. Das Blut wurde nach *Autenrieth* und *Funk*, und zwar sowohl nach der Chloroformmethode wie auch nach der Äthermethode verarbeitet mit dem Unterschied, daß der Äther- bzw. Chloroformauszug im Wasserbad eingeengt und der Rückstand in einer der Blutmenge volumetrisch entsprechenden 96proz. Alkoholmenge gelöst wurde; 0,1 ccm dieser Lösung wurde mit 0,1 ccm destilliertem Wasser versetzt, und es wurden von der Lösung so lange weitere Mengen zugegeben, bis sich der Niederschlag vollkommen löste. Die verbrauchte Menge in Kubikzentimetern war somit bekannt, und aus der Tabelle konnte man den Prozentwert direkt ablesen. Es ist jedoch ratsam, mit einer Testlösung die erhaltenen Resultate zu kontrollieren.

Mit der Äthermethode hatten wir keine Schwierigkeiten, bei der Chloroformmethode dagegen hatten wir öfters leicht trübe alkoholische

Lösungen erhalten. Diese leichte Trübung, welche bei der Ablesung des Resultats unerwartete Schwierigkeiten bietet, wurde durch Zentrifugieren beseitigt, und so lieferte die Chloroformmethode mit der Äthermethode übereinstimmende Resultate. Es ist wahrscheinlich, daß diese Trübung durch die von *Kumagawa* und *Suto* erwähnte, nicht verseifbare und nicht näher bekannte Substanz verursacht wird.

Bezüglich dieser Annahme sowie behufs Vergleichung unserer Methode mit anderen bei Blutcholesterinbestimmungen sind Versuche im Gange.

Literatur.

Authenrieth und *Funk*, Münch. med. Wochenschr. 1913, S. 1243. — *Fex*, diese Zeitschr. **104**, 111. — *Gardner* und *Fox*, Biochem. Journ. **15**, 376. — *Kumagawa* und *Suto*, diese Zeitschr. **8**, 218. — *Windaus*, Zeitschr. f. phys. Chem. **65**, 110.

Zur Untersuchung der Eiweißkörper des Blutes.

II. Mitteilung:

Einwirkung gerinnungshemmender Salze auf Plasma und Serum.

Von

Hermann Hueck.

(Aus der chirurgischen Universitätsklinik Rostock.)

(Eingegangen am 5. Mai 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In der ersten Mitteilung sind Untersuchungen mitgeteilt worden, die an Hand von refraktometrischen und interferometrischen Messungen den wechselnden Eiweißkonzentrationsgrad und die Labilität des Serums beweisen. Vor dem weiteren Bericht neuer Versuche ist die früher angeschnittene Frage zu erörtern, inwieweit künstlich zugesetzte Salze, wie z. B. Natriumcitrat, den Refraktions- und Viskositätswert verändern.

Rein theoretisch betrachtet, wirken die Salze nicht gleichmäßig, z. B. auf die Viskosität. Die mehrwertigen haben eine stärkere Wirkung als die einwertigen (*Adam*). Die neutralen Elektrolyte sollen nach *Pauli* die Eiweißlösung im Sinne einer Steigerung des Hydrosolzustands, Erschwerung der Alkoholgerinnung und Verminderung der Viskosität beeinflussen. Das Paradoxon, daß trotz der Vermehrung der Gesamtzahl der reibenden Teilchen es zu einem Absinken der inneren Reibung unter die der reinen Eiweißlösung kommt, wird durch die Eigenart der Adsorptionsverbindungen erklärt. Die Möglichkeit von Adsorptionsverbindungen zwischen Salzen und Eiweißkörpern wird noch von mehreren Forschern angenommen (*Freundlich*, *Loeb*, *Schade* u. a.). Die Wirkungsweise soll analog der *Hofmeister*schen Reihe erfolgen und außerdem nur in sehr verdünnten Lösungen wirksam sein. Bei höherem Salzgehalt soll die Reibung der Salzteilchen, welche sich zwischen den Eiweißpartikelchen befinden, hinzukommen (*Pauli*). Oberhalb einer gewissen Grenze wird z. B. die Gelatinegallerte zum Schrumpfen gebracht, unterhalb in steigendem Maße zur Quellung. In analoger Weise vollzieht sich die Einwirkung auf die Viskosität. Warum sollte nicht auch die Refraktion durch die Adsorptionsverbindungen in anderer Weise verändert werden als rein additiv?

Natürlich kann aus obiger Einwirkung auf die Gelatine nicht ohne weiteres auf die Wirkung des Na-Citrats auf das Serumeiweiß geschlossen werden. Immerhin dürften die *Hofmeister*schen Reihen in ihrer Wirksamkeit ein allgemein gültiges Gesetz ausdrücken und, da sowohl das Citrat in der Reihe der Anionen, wie das Na in der der Kationen ziemlich am äußeren Ende stehen, ist ihnen wohl eine exzeptionelle Stellung in ihrer Wirksamkeit nicht abzusprechen und legt den Gedanken nahe, daß die mannigfachen Schwankungen in den Befunden bei Citratzusatz in der mittelbaren Salzeinwirkung auf die Serumproteine ihre Erklärung finden.

Wegen Fehlens von Hirudin oder brauchbaren Ersatzes war ich zur Untersuchung von Plasma zunächst auf Salze mit gerinnungshemmender Eigenschaft angewiesen, von denen praktisch das Oxalat, Fluorid und Citrat in ihren Verbindungen mit Natrium, Kalium oder Ammonium in Betracht kommen.

Ein Versuch, 0,1 bis 0,2 Proz. Natriumoxalat dem Blute zuzusetzen, führte zu dem Ergebnis, daß bei der Refraktion die Salzplasmawerte niedriger ausfielen als die Serumwerte. Es spielen sich also physikalisch-chemische Vorgänge ab, die zu analysieren schwer fallen dürfte, zum Teil liegen sicherlich Eiweißfällungen vor (*Leendertz*). Die Befunde decken sich mit denen *Nägelis* und *Alders*, die auch angeben, daß das Oxalatplasma den Brechungswert in falscher und nicht abzuschätzender Weise beeinflussen. Da auch Fluorid Trübungen verursachen soll (*Starlinger*), wurde es nicht verwandt. Ein weiterer Versuch, Na-Citrat in Substanz 0,2 Proz. zuzusetzen, ergab etwas hoffnungsvollere Resultate. Die Refraktion des Plasmas wies in den meisten Fällen wenigstens höhere Zahlen auf als Serum, jedoch erschienen sie oft für den Fibrinogengehalt zu gering. Daher setzte ich im nächsten Versuch dem Serum allein gleiche Mengen Citrat zu, wie ich zur Plasmagewinnung verwandt hatte. Eigentlich hätte ich im Volumprozentverhältnis des Gesamtblutes zum Plasma (etwa 100 : 60) das Salz beigeben müssen, also noch mehr wie oben. Aber da nicht bekannt ist, ob und in welchem Verhältnis die Erythrocyten das Citrat adsorbieren, begnügte ich mich mit 0,2 Proz. Zusatz in der Gewißheit, sicher nicht zu viel zugesetzt zu haben.

Bönninger und *Hermann* treten dafür ein, daß Citrat- und Oxalatsalze nicht in die Blutkörperchen eindringen.

Tabelle V.

Serum in Eiweiß-Proz.	6,12	7,63	7,59	7,93	8,71	7,74	7,74	9,14
Serum + 0,2 Proz. Citrat in Substanz	6,25	7,78	8,72	7,98	8,79	7,78	7,83	9,33
Plasma bei 0,2 Proz. Citratzusatz gewonnen	6,23	7,85	8,06	8,02	8,13	8,19	7,76	9,44

Während der Brechungswert einer 0,2proz. Na-Citratlösung in Wasser 15,8 Pulfrichseinheiten beträgt, gegenüber dem reinen Wasserwert 15, also 0,8 Pulfrichseinheiten — das wäre bei einer fälschlichen

Umrechnung auf der Bluteiweißtabelle 0,18 Proz. —, sieht man aus der Tabelle V, daß sich der Salzwert hier keineswegs zum Serumwert zuaddiert, sondern in den verschiedensten Variationen zwischen 0,05 und 0,19 schwankt; von der letzten Reihe abgesehen, liegt er unterhalb der zu erwartenden Differenz 0,18. Dagegen liegt der Plasmawert fünfmal unterhalb des Citratserumwertes, nur dreimal oberhalb. Die Unmöglichkeit einer exakten Berechnung des Fibrinogens aus solchem Verfahren liegt auf der Hand.

Man muß bei Untersuchungen über die Wirksamkeit der Salze die Einwirkung auf das Vollblut von der auf das Plasma bzw. das Serum trennen. Der Gedankengang der fehlerhaften Einwirkung einer nicht isotonischen Salzlösung auf das Blut ist nicht neu. Mir lag daran, in obiger Tabelle an extremem Beispiel nachzuweisen, daß *die Einwirkung des Na-Citrats nicht gleichsinnig erfolgt, sondern daß die Fehlerquelle selbst beim Serum sichtlich schwankt.* Dasselbe muß theoretisch mutatis mutandis auf alle nicht isotonischen Salzlösungen zutreffen, die bei den verschiedensten Blutuntersuchungen angewandt wurden (*Pfeiffer, Kossler, Foster-Whipple, Gram, Gebr. Bleibtreu, Kämmerer* und *Waldmann, Gebr. Löhr*).

Starlinger ist kürzlich für die Verwendung von Na-Citrat in Substanz eingetreten. Er erklärt die vorhandenen Fehler beim Citratplasma durch eine Verdünnung, die infolge Hypertonie des Salzes durch Wasseraustritt aus den Erythrocyten zustande käme. Demzufolge findet auch er meist niederere Eiweißwerte als beim Nativ- oder Hirudinplasma, manchmal gleichen Wert, selten Überhöhungen. In letzterem Falle überwiege eben der Salzbrechungswert über den Wassereinstrom. Den zustandekommenden Verdünnungsfaktor schlägt er aber für so gering an, daß er zu übersehen bzw. durch Addition eines kleinen berechneten Wertes wettzumachen ist. Er rechnet im übrigen aber mit einem reinen Additionswert des Salzes zum Eiweißwert und sagt, die oben angedeutete Fehlerquelle würde ausgeschaltet, wenn man nur Nativplasma verwerte, gleichgültig, ob man dann den Salzzusatz in Lösung oder Substanz vornähme.

Der Auffassung eines gleichmäßigen, also zu berechnenden Salzfehlers, kann ich mich nicht anschließen. Daß ein nicht isotonischer Salzzusatz zum Gesamtblut die Eiweißwerte ändert, leuchtet jedem Nachdenkenden nach obigem ein. Ob der Salzfehler oder bei Lösungen der Salzwasserfehler aber gleich ist, ist zu diskutieren, besonders aber, ob unabhängig von der Blutkörpercheneinwirkung die reine Einwirkung auf das Serum je nach seiner Zusammensetzung schwankt. Die ersten beiden Reihen der Tabelle V zeigen, daß sich der Salzwert eines 0,2 proz. Substanzzusatzes nicht einfach zum Eiweißwert addiert, sondern den Refraktionswert des Serums unkontrollierbar verändert. Meist steht

die Erhöhung unter dem berechneten Salzwert, einmal auch darüber. Die folgenden Versuche beschäftigen sich noch eingehend mit dem Problem.

Ehe die Einwirkung des Salzes in verschiedener Konzentration auf das Serum untersucht wurde, setzte ich dreibasiges Na-Citrat in zunehmender Stärke Aqua dest. zu und trug die refraktometrisch gefundenen Werte in ein Koordinatensystem ein.

Es wurden zweimal Proben aus der gleichen Apotheke, aber zu verschiedenen Zeiten geliefert, geprüft, das dritte Mal ein aus dem pharmakologischen Institut bezogenes Salz. Die Wägungen und Verdünnungen waren einmal von mir ausgeführt, zweimal im pharmakologischen Institut, um eine mögliche Fehlerquelle infolge schlechten Gewichtssatzes oder fehlerhafter Pipetten auszuschalten. Die Befunde sind auf Abb. 1 eingetragen. Die Ordinate zeigt die Zahl der Pulfrichseinheiten, die Abszisse den Konzentrationsgrad der Citratlösung.

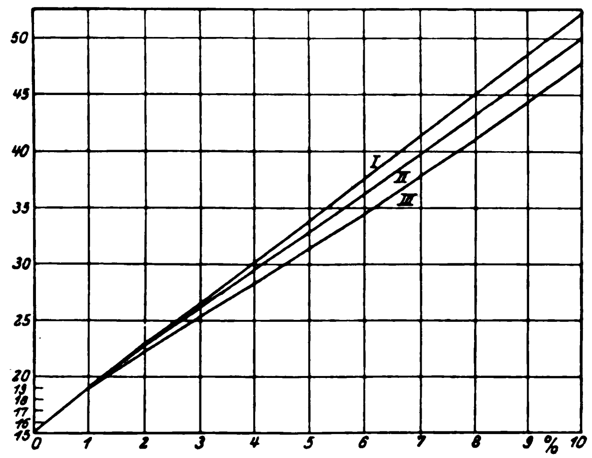


Abb. 1. Refraktionskurven von Natriumcitratlösungen in Aqua dest.

Es geht aus den drei Kurven hervor, daß die verwendeten Citratsalze offenbar von verschiedener Reinheit waren, was sich bei den höheren Konzentrationen deutlich ausspricht. Bei den bei Substanzzusatz zum Blute oder Serum in Frage kommenden Konzentrationen (0,2 bis 1 Proz.) sind die Differenzen aber sehr gering, bei 1 Proz. Maximal 0,2 Pulfrichseinheiten. Die Kurven zeigen trotz ihrer Divergenz bei höherer Konzentration genau gleichen Charakter. Sie scheinen bis 1 Proz. linear zu verlaufen, biegen dann aber alle etwas ab. Die Refraktionserhöhung pro 0,1 Proz. Citraterhöhung wird aus den drei Kurven wie folgt errechnet:

Tabelle VI.

Refraktionsanstieg pro 0,1 Proz. Citratsteigerung.

Kurve I . . .	0,4	0,38	0,38	0,376	0,375	0,374
„ II . .	0,4	0,4	0,375	0,358	—	0,353
„ III . .	0,4	0,38	0,355	0,33	0,328	0,331 (?)
Citrat-Prozentgehalt . . .	0,1—0,5	0,6—1	2	5	8	10

Die Tabelle VI zeigt bei drei verschiedenen Citratproben gleichsinnig, daß bei höheren Konzentrationen der Refraktionswert proportional geringer wird als bei den niederen Konzentrationen zu erwarten wäre. Ähnliche Beobachtungen scheinen verschiedentlich gemacht zu sein.

Hafner und *Kürthy* berichten z. B. kürzlich über interferometrische Untersuchungen verschiedener Stoffe, bei denen in geringer Konzentration die Verschiebung des Interferenzstreifens eine lineare Funktion der Konzentration zu sein scheine, während bei höheren Konzentrationen eine allmähliche Krümmung dieser anfangs geradlinigen Kurve gefunden wird, die sich beim Phenol beispielsweise schon bis zur 1proz. Lösung bemerkbar mache. Die Autoren erklären das Phänomen durch Bildung von Autokomplexen bei höheren Konzentrationen, es seien also proportional weniger lichtbrechende Teilchen da. Die Tatsache, daß *F. M. Raoult* bei konzentrierten Phenollösungen eine zu niedere Molekulardepression bei der Kryoskopie fand, spräche auch für diese Ansicht.

Diese angenommene Bildung von Autokomplexen scheint mir für die einfache Na-Citratlösung wenig wahrscheinlich, vielmehr vermute ich, daß die stärkere Ionendissoziation bei starken Verdünnungen die Hauptrolle spielen mag, die also auf diese Weise durch relative Vermehrung der lichtbrechenden Teilchen in den gering konzentrierten Lösungen einen relativ zu hohen Refraktionswert ergibt gegenüber höherer Konzentrationen. Jedenfalls erhalten wir für die wässerigen Citratlösungen in geringen Verdünnungen einen Zuwachs an Refraktion von 0,4 bis 0,38 pro 0,1 Proz., welche Werte mit denen von *Starlinger* übereinstimmen. Nur nimmt dieser an, daß der Wert 0,4 konstant sei und sich beim Citratzusatz zum Serum gleichfalls additiv zum Serumwert verhalte.

Um diese Verhältnisse nachzuprüfen, wurden verschiedene Seren in aufsteigender Konzentration mit Na-Citrat versetzt. Es wurde die Refraktion und Viskosität dieser mit Salz beschickten Sera bestimmt, und daraus die Albumin-Globulinverhältnisse nach *Rohrer* berechnet. Es kam nur das Salz zur Verwendung, das zur Wasserlösungskurve II und III verwandt war, daher sind die Werte der Lösungen II und III hier nochmals zum Vergleich notiert. Es entspricht die Serumreihe I und II der

wässerigen Lösung III, die Serumreihen III und IV der wässerigen Lösung II. Die Refraktionswerte sind hier wie später der Einfachheit halber nur in Pulfrichseinheiten angegeben.

Aus der Tabelle VII geht hervor, daß bei Zusatz von Na-Citrat in Substanz zum Serum für die Refraktion ein gewisser Verlust an brechenden Körpern festzustellen ist. Der Salzwert verhält sich hier also nicht rein additiv zum Serum. Daß bei stärkeren Konzentrationen die Refraktionsverluste proportional nicht so hoch sind, ist wohl durch die Annahme zu erklären, daß die Eiweißkörper nach einem gewissen Maß von Adsorption des Salzes kein weiteres Citrat mehr aufnehmen können und sich ein weiterer Zusatz rein additiv im Refraktometer

Tabelle VII.

Refraktionsanstieg bei aufsteigender Citratserumlösung im Vergleich zu Citratwasserlösung.

	Aqua dest. reines Serum	0,1 proz. Na-Citrat	0,2 proz.	0,3 proz.	0,4 proz.	0,6 proz.	0,8 proz.	1 proz.	2 proz.	5 proz.
Aqua dest. Lösung III										
Refraktion	15,0	15,4	15,8	16,2	16,6	17,3	18,1	18,8	22,1	31,5
Refraktionsdifferenz mit rein. Aqua dest.	—	0,4	0,8	1,2	1,6	2,3	3,1	3,8	7,1	16,5
Serum I										
Refraktion	57,1	57,4	57,7	58,1	58,4	59,0	59,2	59,4	63,5	73,2
Viskosität	1,87	1,87	1,87	1,87	1,88	1,88	1,89	1,90	1,93	2,08
Refraktionsdifferenz mit reinem Serum	—	0,3	0,6	1,0	1,3	1,9	2,1	2,3	6,2	16,1
Albumin-Globulin . .	30/70	32/68	35/65	37/63	37/63	40/60	39/61	38/62	53/47	etwa 75/25
Serum II										
Refraktion	55,8	56,1	56,5	56,8	57,2	57,9	58,5	59,0	62,0	71,6
Viskosität	1,70	1,70	1,70	1,71	1,73	1,73	1,74	1,74	1,77	1,90
Refraktionsdifferenz.	—	0,3	0,7	1,0	1,4	2,1	2,7	3,2	6,2	16,0
Albumin-Globulin . .	56/44	58/42	60/40	59/41	58/42	61/39	61/39	63/37	72/28	85/15
Aqua dest. Lösung II										
Refraktion	15,0	15,4	15,8	16,2	16,6	17,4	18,2	19,0	22,5	32,9
Refraktionsdifferenz.	—	0,4	0,8	1,2	1,6	2,4	3,2	4,0	7,5	17,9
Serum III										
Refraktion	63,4	63,3	63,8	64,2	64,6	65,2	65,8	66,3	70,0	80,2
Viskosität	2,0	2,0	2,0	2,0	2,01	2,03	2,05	2,06	2,1	2,27
Refraktionsdifferenz.	—	-0,1	0,4	0,8	1,2	1,8	2,4	2,9	6,6	16,8
Albumin-Globulin . .	44/56	43/57	46/54	48/52	48/52	49/51	48/52	50/50	60/40	etwa 80/20
Serum IV										
Refraktion	55,2	55,4	55,8	—	56,6	57,3	—	58,3	62,4	72,3
Viskosität	1,78	1,78	1,78	—	1,78	1,79	—	1,82	1,86	2,1
Refraktionsdifferenz.	—	0,2	0,6	—	1,4	2,1	—	3,1	7,2	17,3
Albumin-Globulin . .	37/63	38/62	40/60	—	45/55	47/53	—	47/53	60/40	etwa 70/30

anzeigt. Wieweit Änderungen im Quellungszustand der Eiweißkörper eine Rolle spielen, entzieht sich unserer Kenntnis.

Als weitere wichtige Erscheinung ist zu vermerken, daß bei zunehmender Salzkonzentration die Viskositätszunahme nicht Schritt hält mit der Erhöhung der Refraktion. Es erleidet so bei der Berechnung der Teilfraktionen nach *Rohrer* das Albumin-Globulinverhältnis eine Verschiebung in dem Sinne, daß eine erhebliche Albuminzunahme vorgetäuscht wird. Daß diese Albuminzunahme durch den Salzeinfluß tatsächlich eintritt, ist wohl nicht anzunehmen.

Im nächsten Versuch habe ich mich der Frage zugewandt, inwieweit durch verschiedene Zusätze von Salzen und Flüssigkeiten die obige Berechnung der Teilfraktionen eine Veränderung erfährt.

Es wurde untersucht im Vergleich zu reinem Serum Mischungen dieser Sera mit verschiedenen Flüssigkeiten im Mischungsverhältnis 10 : 1, und zwar mit Aqua dest., Tyrode, 3,6proz. Na-Citratlösung, die als blutisotonisch angenommen wird, 25proz. Na-Citratlösung, die von den *Gebr. Löhr* verwandt wurde, und 0,2 proz. Na-Citratzusatz in Substanz.

Alder kam bei Mischungen mit verdünnter NaCl-Lösung zu scharf übereinstimmenden Werten.

Der Raumersparnis halber verzichte ich auf Wiedergabe der Tabellen und fasse nur kurz das Resultat dieser Untersuchungen zusammen: Die Verhältniszahlen des Albumins zu Globulin werden durch die Zusätze von Aqua dest., Tyrode und 3,6proz. Citratlösung zum Serum nicht wesentlich beeinflußt. Die kleinen Differenzen bis 7 Proz. liegen wohl im Bereich der Fehlerquelle, wenngleich nach der Literatur nur 3 bis 5 Proz. als Fehler angenommen wird. Immerhin kann aus den kleinen Abweichungen kein bindender Schluß gezogen werden, daß Mischungen mit obigen Flüssigkeiten bis zum Verdünnungsverhältnis 1 : 10 die Berechnung der Eiweißverhältniszahlen im Serum allein wesentlich ändere. Auch der 0,2proz. Substanzzusatz ändert, wie zu erwarten, die Verhältniszahl nicht wesentlich. Beim Zusatz der 25proz. Lösung jedoch — allerdings ist der Zusatz stärker als *Löhr* ihn vornimmt — ändert sich die Verhältniszahl der Teilfraktionen wesentlich.

Die divergierenden Werte bei Zusatz von 25proz. Citratlösung werden naturgemäß noch krasser in Erscheinung treten, wenn statt Serum Plasma zur Untersuchung gewählt wird; denn dieses enthält den veränderlichsten und labilsten der Bluteiweißkörper, das Fibrinogen. Dasselbe wird zwangsläufig auf die Salz- und Wasserzusätze am stärksten reagieren.

In den ersten Reihen der folgenden Tabelle habe ich die Zusätze zum Gesamtblut in der gleichen Höhe vorgenommen wie zum Serum. Da aber, wie oben schon erwähnt, nicht bekannt ist, ob sich die Salzeinwirkung auf das Plasma und die Blutkörperchen gleichmäßig verteilt, wurde in einer zweiten Serie unter Zugrundelegung einer Verhältniszahl vom Gesamtblut zum Plasma von 100 : 60 der Salzwasserzusatz so gewählt, daß zum reinen Serum in entsprechendem Verhältnis mehr zugesetzt wurde, was der Annahme entspräche, daß das Citrat beim

Tabelle VIII.

Serum	I	II	III	IV	V	VI
a) Reines Serum ϱ	56,8	58,4	62,0	57,5	57,5	56,3
η	1,73	1,80	2,0	1,8	1,7	1,74
Albumin-Globulin	55/45	51/49	37/63	46/54	64/36	51/49
b) Serum + 25proz. Citratlösung 100/5 ϱ	58,3	60,4	63,0	58,5	58,5	58,2
η	1,93	1,87	2,03	1,77	1,77	1,80
Albumin-Globulin	27/73	48/52	37/63	56/44	56/44	50/50
c) Plasma bei 25proz. Citratzusatz zu Blut 100/5 ϱ	57,3	57,6	59,3	58,4	55,7	56,1
η	1,87	1,87	2,07	1,93	1,63	1,88
b — a) Refraktion	1,5	2,0	1,0	1,0	1,0	1,9
c — b) Refraktion	—1,0	—2,8	—3,7	—0,1	—2,8	—2,1

Tabelle IX.

Serum	Serum VII gleiches wie VI	VIII	IX	X
a) Reines Serum ϱ	56,3	54,6	64,0	56,4
η	1,74	1,73	1,94	1,73
Albumin-Globulin	51/49	43/57	55/45	53/47
b) Serum + 25proz. Citratlösung 60/5 ϱ	59,6	56,6	67,4	59,5
η	1,80	1,77	1,99	1,76
Albumin-Globulin	56/44	47/53	65/35	62/38
c) Plasma bei 25proz. Citratzusatz zu Blut 100/5 ϱ	56,1	56,3	62,7	56,6
η	1,88	1,9	2,14	1,80
b — a) Refraktion	3,3	2,0	3,4	3,1
c — b) Refraktion	—3,5	—0,3	—4,7	—2,9

Zusatz zum Vollblut nur eine Verbindung mit dem Plasma einginge, die korpuskulären Elemente aber unbeeinflußt ließe. Die Wirklichkeit liegt wohl in der Mitte. Die wahren physiologischen Bedingungen bekommt man bei solchen Versuchen doch nie heraus, selbst wenn man von Fall zu Fall die jeweilige Höhe der festen Bestandteile vorher errechnet.

Löhr setzt zu 40 ccm Blut 2 ccm seiner 25proz. Citratlösung zu, d. i. 5 Lösung : 100 Blut. Dieses Verhältnis wurde immer beibehalten, in der ersten Serie aber die gleiche Lösungsmenge mit 100 Teilen Serum vermischt, in der zweiten mit 60 Teilen. *Löhr* versucht den Einwand gegen sein 25proz. Citratplasma dadurch zu entkräften, daß er meint, die Fehlerquelle sei stets die gleiche.

Die Resultate der beiden Serien laufen, wie zu erwarten war, in gleicher Richtung, nur sind bei letzterer die Ergebnisse ausgesprochener. Es geht daraus folgendes hervor: Die Refraktion wie Viskosität wird durch den Zusatz von 25proz. Citratlösung zu verschiedenen Seren

auch in diesen Mischungsverhältnissen nicht in gleicher Stärke beeinflußt, wie die Differenz der Rubriken b und a zeigt. Gleichfalls weisen die Verhältniszahlen von Albumin zu Globulin zum Teil ungesetzmäßige Schwankungen auf. Weiter führt der Zusatz von 25proz. Citratlösung zum Gesamtblut zu Refraktionswerten des Plasmas, die zwar höher liegen als die für reines Serum, aber sämtlich tiefer sind als die für Serum, das mit gleicher Citratmenge beschickt war. Der Gedanke, aus dieser Differenz (Rubrik c — b) einen Fibrinogenwert berechnen zu wollen, führt zu dem Paradoxon eines ganz verschieden hohen negativen Wertes (— 0,1 bis — 4,7). Die Erklärung ist neben allerhand unübersehbaren Zustandsänderungen der Gesamteiweiße in einer partiellen Fibrinogenfällung zu suchen, denn die stets auftretende Trübung des Plasmas bei diesem stark hypertonischen Zusatz ließ sich durch Zentrifugierung nicht fortbringen, beruhte also nicht auf den gewöhnlichen die Plasmatrübung verursachenden Plättchen, sondern wahrscheinlich auf Eiweißfällung. Diese Eiweißniederschläge drücken sich refraktometrisch offenbar nicht mehr aus, oder jedenfalls nur sehr gering, während sie bei der Viskosität naturgemäß stark in Erscheinung treten. Das bedingt, daß die Viskositätswerte bei dem so gewonnenen Plasma meist unverhältnismäßig hohe sind, meist höhere als die des Citratserums, obwohl die Refraktionswerte sich umgekehrt verhalten. Zum Zustandekommen der niedrigen refraktometrischen Plasmawerte wird zum Teil aber auch ein Wasseraustritt aus den Erythrocyten auf Grund osmotischer Wechselwirkung zwischen der hypertonischen Citratlösung und den Blutkörperchen eine Rolle spielen, welcher Fehler je nach Konstitution der Erythrocyten und Dauer der Einwirkung als variabel einzuschätzen ist. Die Behauptung *Löhrs*, daß sein Salzzusatz als gleicher Faktor die Richtigkeit seiner Werte nicht beeinflusse, dürfte also wohl nicht zu Recht bestehen.

Noch ein anderer Einwand ist gegen die *Löhr*sche Methode als solche zu erheben, nämlich, daß er in dem Hauptteil seiner Untersuchungen das Citratplasma zur Bestimmung der Teilfraktionen verwendet. Die *Rohrer*sche Tabelle ist empirisch auf Befunden von reinen Albumin-Globulinmischungen aufgebaut, ohne einen Fibrinogenzusatz, und *Rohrer* bezieht seine Kurven auch nur auf das Serum. Folglich darf man sie meines Erachtens auch nur auf das Serum anwenden.

Alder sagt zwar einmal: „Trägt man in die *Nägeli-Rohrer*sche Tabelle auch die Hirudinplasmawerte ein, so bewegen sich die erhaltenen Punkte ähnlich wie die Serumpunkte in den Kurven. Sie machen genau gleiche Schwankungen mit." Dieser Auffassung gegenüber kann ich mich auch für das Hirudinplasma gewisser Zweifel nicht erwehren. Außerdem arbeitet *Alder* nur mit physiologischen Seren, also bei ziemlich gleichem Fibrinogenwert. Das Fibrinogen gehört aber zu den höchstviskösen Eiweißstoffen;

wenn man es auch in physikalisch-chemischer Hinsicht unter gewissen Einschränkungen zu der Globulinfraktion rechnen könnte (*Linzenmeier* und andere), so beeinflußt es doch durch seine äußerst starke Viskosität, die unverhältnismäßig höher ist als die entsprechende Refraktion, nach der Umrechnung in der *Rohrer*schen Tabelle die Globulinzahl derart stark, daß ein erheblicher Fehler zustande kommt. Auch entspricht die in pathologischen Fällen doch höchstens bis 0,9 Proz. heraufgehende Fibrinogenquote keineswegs der fingierten starken Globulinverschiebung. Die zwei von *Löhr* zitierten Werte für Hirudinplasma in der Albumin-Globulinzahl 0 : 100 liegen tatsächlich schon außerhalb der Kurventabelle. Ich könnte solche Plasmawerte von 0 : 100 bei 25proz. Citratzusatz beliebig vermehren. Man kann doch nicht annehmen, daß in diesem Plasma kein Albumin mehr vorhanden ist! Was für Hirudinplasma von mir nicht in eigenen Versuchen widerlegt werden kann, muß ich für das Citratplasma bei seinen variablen Fehlern strikte ablehnen. *Löhr* betont zwar verschiedentlich, daß es sich bei diesen Zahlen nur um Annäherungswerte handele. Warum werden denn aber ganze Tabellen von Albumin-Globulinbestimmungen aus Salzplasma aufgestellt, die auf so zahlreichen, unübersehbaren Fehlerquellen fußen? Man darf also meines Erachtens die *Rohrer*sche Berechnung der Serumteilfraktionen nicht auf das Plasma ausdehnen.

Die beiden gegen die *Löhr*sche Methodik getroffenen Einwände sollen aber nicht aussagen, daß die Gesamtergebnisse seiner Arbeit unrichtig seien. Wie im klinischen Teil[1]) meiner Arbeit gezeigt wird, komme ich mit meiner Methode für reine Serumuntersuchungen zu ganz ähnlichen Resultaten. Das sagt aber nur aus, daß die Eiweißverschiebungen im Blute, z. B. nach Operationen oder anderen Insulten, so grobe sind, daß sie sich bei jeder Methodik ausdrücken, auch wenn mit erheblichen Fehlerquellen gearbeitet wird.

Wenden wir uns in diesem Zusammenhang nochmals der 3,6proz. Citratlösung zu, die *Leendertz* als isotonisch hinstellt, so ergeben die Versuche in der von *Leendertz* angewandten Verdünnung von 9 : 1 bei Zusatz zu reinem Serum im großen und ganzen eine gute Gleichmäßigkeit der Werte. Die Refraktionsdifferenz — abgesehen von zwei Ausnahmen — ist ziemlich konstant, und die Verhältniszahl der Teilfraktionen schwankt in der als Fehlerquelle anerkannten Breite. Auf tabellarische Wiedergabe dieser Versuchsreihe muß auch aus Raummangel verzichtet werden.

Der Umstand, daß 3,6proz. Citratlösung das Serum in seiner inneren Struktur nicht wesentlich zu beeinflussen scheint, sagt aber noch nicht, daß beim Plasma die gleichen Verhältnisse vorliegen. Bei der Labilität des Fibrinogens muß man von vornherein die Möglichkeit einer verschiedenen Einwirkung ins Auge fassen. In der folgenden Tabelle sind die Resultate von einigen Reihenuntersuchungen aufgeführt, bei denen der Citratzusatz sowohl zu Vollblutserum und

---

[1]) Erscheint demnächst im Arch. f. klin. Chir.

Plasmaserum erfolgt war, wie auch zu reinem Plasma, das mit paraffiniertem Instrumentarium (Technik, s. erste Mitteilung) gewonnen war, wie endlich zum Gesamtblut. Das aus letzterem gewonnene Plasma könnte also eventuell durch Erythrocytenveränderung mit beeinflußt sein.

Der Citratzusatz ist hier entsprechend der ursprünglichen Angabe von *Leendertz* und *Gromelski* im Verhältnis 1 : 5 gewählt. Beim Zusatz zum Gesamtblut wurde wieder die Annahme einer ausschließlichen Bindung der Citratlösung durch das Plasma zugrunde gelegt und daher in der Voraussetzung eines ungefähren Mengenverhältnisses von Gesamtblut zu Plasma von 100 : 60 die Mischung 8,33 ccm Blut zu 1 ccm 3,6 proz. Citratlösung vollzogen.

Die Tabelle X weist verschiedene Tatsachen auf. Bei dem Vergleich der Refraktometerwerte allein zeigt die Differenz zwischen Serum (Vollblutserum wie auch Plasmaserum) und dem mit Citrat beschickten Vergleichsserum wieder annähernd gleiche Werte (5,2 bis 5,6 Pulfrichseinheiten). Die Differenzen zwischen dem Plasma- und Citratplasmawert sowohl in der ersten wie zweiten Form sind im Durchschnitt größer und weisen auch unter sich erhebliche Schwankungen auf (5,5 bis 7,5 Pulfricheinheiten). Diese Tatsache allein zeigt, *daß in den meisten Fällen durch den Citratzusatz zum Plasma auch in der sogenannten isotonischen Form mehr für die Refraktion verloren geht, als dem Lichtbrechungsverlust beim Zusatz zum Serum enspricht.* Da Trübungen nicht

Tabelle X.

		I	II	III	IV	V
Volblutserum	ϱ	53,7	56,7	57,4	57,5	53,6
	η	1,6	1,87	1,77	1,73	1,83
Albumin-Globulin		67/33	27,73	51/49	59/41	15/85
Vollblutserum + 3,6 proz. Citratlösung 5: 1	ϱ	48,5	51,1	51,8	52,3	49,2
	η	1,5	1,73	1,6	1,58	1,71
Albumin-Globulin		63/37	20/80	57/43	64/36	10/90
Plasmaserum	ϱ	54,0	56,7	57,6	57,4	53,8
	η	1,6	1,87	1,77	1,73	1,83
Albumin-Globulin		68/32	27/73	52/48	58/42	17/83
Plasmaserum + 3,6 proz. Citratlösung 5: 1	ϱ	48,7	51,2	52,2	52,2	49,7
	η	1,5	1,7	1,6	1,58	1,71
Albumin-Globulin		64/36	28,72	58/42	63/37	14/86
Reines Plasma	ϱ	55,7	58,7	60,0	58,3	56,2
	η	1,77	2,13	2,13	1,87	2,23
Plasma + 3,6 proz. Citratlösung 5: 1	ϱ	49,5	51,3	54,2	53,6	52,2
	η	1,6	1,88	1,83	1,70	2,01
Plasma bei 3,6 proz. Citratzusatz zum Gesamtblut gewonnen 8,33: 1	ϱ	49,3	53,2	53,5	52,2	51,8
	η	1,63	1,93	1,83	1,70	2,03

auftreten — die anfängliche Plättchentrübung ist durch Zentrifugieren zu beseitigen —, außerdem die Einwirkung auf die Erythrocyten allein es nicht sein kann — denn auch beim Zusatz zu reinem Plasma erscheint die stärkere Differenz —, muß die Veränderlichkeit des Fibrinogens als mutmaßliche Erklärung herhalten, solange wir keine exakte Beweisführung haben. Einen Vergleich der beiden Plasmaarten untereinander möchte ich nicht ausspinnen, da wir durch den willkürlich gewählten Zusatz nie wissen, ob die Verdünnung in der letzten Rubrik einigermaßen der in der vorletzten adäquat war. Die Differenzen in den Viskositätswerten beim Plasma sind noch grotesker und erklären sich nach dem oben Gesagten einmal durch die sehr hohe Zähigkeitskonstante des Fibrinogens, zum anderen bei Salzzusätzen durch eine uns unbekannte Zustandsänderung des Fibrinogens.

Zu diesen Viskositätsschwankungen sei eine Beobachtung *Adams* erwähnt. Dieser fand eine Vikositätserhöhung gewisser Flüssigkeiten bei Zusatz von Jodiden, eine Erniedrigung bei dem von NaCl und Bromiden. Bei einer Serum-Albuminlösung war aber die Salzeinwirkung schon in niederen Konzentrationen ausgesprochener als bei einfacher Salzlösung, beim Plasma trat die Einwirkung noch eher in Erscheinung. Also auch hiernach scheint die Viskositätssteigerung, wenn auch gleichsinnig, so doch in verschiedener Stärke aufzutreten, je nach dem vorliegenden Gehalt an Plasmaproteinen.

Der Versuch, die Refraktions- und Viskositätswerte der drei letzten Rubriken in die *Rohrer*sche Tabelle einzutragen, zeigt sofort die erheblich höheren Differenzen der Teilfraktionen bei ein und demselben Plasma. Ich führe diese Zahlen in der Tabelle absichtlich nicht an, weil ich, wie oben dargetan, eine solche Ausrechnung beim Plasma für nicht sinngemäß halte. Versucht man endlich, eine Fibrinogenberechnung aus der Refraktionsdifferenz zwischen Plasma und Serum aufzustellen, so fällt sie bei der reinen Materie stets abweichend aus gegenüber den durch Citratzusatz verdünnten Flüssigkeiten.

Fibrinogenbestimmung.

Man muß sich darüber klar sein, daß wir nie wissen, in welchem Zustand der Umwandlung vom Fibrinogen zum Fibrin wir diesen labilen Eiweißkörper durch unsere sogenannten gerinnungshemmenden Mittel fixieren. Ich will auf den komplizierten und vielumstrittenen Gerinnungsprozeß nicht näher eingehen, verweise nur auf die hauptsächlichsten modernen Bearbeitungen des Problems durch *Morawitz*, *Nolf*, *Hekma* und *Stuber-Sano*, deren Anschauungen unter sich stark differieren. Welcher Ansicht man in dieser Frage auch zuneigen möge, sicher ist, daß mehrere Phasen zwischen dem flüssigen Sol- und dem festen Gelzustand dieser Substanz liegen, und daß wir weder refraktometrisch, noch viskosimetrisch erkennen können, in welchem Stadium

das Fibrinogen vor uns liegt und wieviel Prozent von dem „flüssigen" Eiweiß wir tatsächlich meßbar noch untersuchen können. Alle Differenzen bei den verschiedenen Methoden zeigen uns diese Labilität an und sollten uns von der Unvollkommenheit aller hier erwähnten Verfahren überzeugen.

Daß *Leendertz* bei der zweiten seiner angegebenen Fibrinogenbestimmungen neben der Citratlösung auch noch Calciumchlorid zur Ausfällung zusetzt und diese Methode sogar als „ohne Fehlerquelle" anspricht, sei kurz erwähnt. In eigenen Versuchen wurde dies Verfahren nicht durchgeprüft. Ich glaube aber in der Annahme nicht fehlzugehen, daß durch den Zusatz des zweiten Salzes die Fehlerquelle nur erhöht wird.

Gleiche Zweifel habe ich gegenüber der *Starlinger*schen Methode, die auf 0,2 proz. Citratsubstanzzusatz zum Plasma beruht. Auch diese Methode konnte von mir nicht durchgeprüft werden. Interessant ist mir in dieser Richtung bei den Untersuchungen *Starlingers*, daß er bei zahlreichen Ergebnissen die in zwei Parallelmethoden — eine mit, eine ohne Salzzusatz — gefunden wurden, Differenzen feststellt. Diese Differenz zwischen beiden Werten soll „als annäherndes Maß für jenen Teil des Fibrinogens angenommen werden, der bei stabilisierenden Milieuveränderungen seine physikalisch-chemische Eigenart verliert und in manchen die Eigenschaften der Serumglobuline annimmt, könne also unmittelbare Angaben über den jeweiligen Stabilitätszustand des Fibrinogens. . . . vermitteln."

Ohne zu der *Starlinger*schen Erklärung Stellung nehmen zu wollen, konstatiere ich nur, daß auch er bei Salzzusatz zum Plasma verschiedentlich tiefere Fibrinogenwerte findet als bei der Berechnung aus reinem Plasma und Serum, welches Resultat gleichsinnig mit dem meinen läuft.

Mit ein paar Worten möchte ich noch eingehen auf die Methode von *Starlinger*, die mir von den Fibrinogenbestimmungen auf Grund der Refraktionsdifferenz am besten erscheint. Schon vor Kenntnis der *Starlinger*schen Arbeit war ich auf das gleiche Verfahren verfallen, nämlich *der Differenzbestimmung zwischen den Refraktionswerten des reinen Plasmas und des reinen Serums.* Ich kann die Feststellung *Starlingers* nur bestätigen, daß die Verwertung des Nativplasmas mittels paraffinierten Instrumentariums, „wenn auch nicht leicht, so doch bei entsprechender Übung durchaus möglich und exakt verwertbar ist". Nach Blutentnahme in paraffiniertes Röhrchen, kurzer scharfer Zentrifugierung und Abheberung mit paraffinierter Pipette wird das wahrscheinlich kaum veränderte Plasma auf das Prisma des Refraktometers gebracht. Wenn die Zimmertemperatur einigermaßen auf die des Wasserbads, d. i. 17,5° C, eingestellt ist, braucht das Plasma

nur wenige Minuten bis zur konstanten Einstellung. Diese Zeit genügt, um einen genügend exakten Lichtbrechungswert abzulesen, ehe die Gerinnung einsetzt. Während dieser Minuten ist die Viskosität am bereitgestellten Viskosimeter bequem festzustellen. Vom so gefundenen Plasmawert wird der Refraktionswert des Serums abgezogen, welche Differenz den Fibrinogenwert ausmacht. Ob zur Serumbestimmung Vollblutserum oder Plasmaserum verwandt wird, ist nach meinen früheren Ausführungen gleichgültig. *Jedenfalls scheint mir der Fehler, der bei dieser Methode in einer vielleicht schon in Anfängen einsetzenden Gerinnung versteckt liegt, geringer zu sein als der im Salzzusatz beruhende Fehler.* Etwas geringere Fibrinogenwerte als in der Tat vorhanden sind, wird man vermutlich auch bei dieser Methode leicht bekommen. Allerdings stimmen sie nach *Starlingers* Vergleichsbestimmungen mit den Werten des Hirudinplasmas genau überein.

Die von mir bei verschiedenen chirurgischen Erkrankungen gefundenen Fibrinogenwerte lagen zwischen 0,17 und 0,82 Proz., decken sich also in ihrer Höhe ungefähr mit den Befunden anderer Autoren.

Zusammenfassung.

Refraktometrische und viskosimetrische Untersuchungen am Vollblut, Plasma und Serum führten zu einer Reihe von Erkenntnissen, die zum Teil neu oder wenig beachtet scheinen, zum Teil die Befunde früherer Autoren bestätigen, zum Teil sich mit denselben nicht decken.

Die Refraktometerwerte von nativem Serum und solchem, das aus defibriniertem Blut gewonnen ist, unterscheiden sich meistens wesentlich voneinander (bis 0,26 Pulfricheinheiten), und zwar wird das native Serum überwiegend höher konzentriert gefunden.

Fast ausnahmslos läßt sich mittels des Refraktometers eine Schichtung des Serums nachweisen, das spontan nach der Gerinnung des Blutes aus dem Blutkuchen gepreßt ist. Eine Untersuchung von Serum in den verschiedenen Auspressungsphasen zeigt namhafte Differenzen im Lichtbrechungsvermögen. In den ersten 4 bis 5 Stunden sind die Konzentrationsänderungen nicht gleichsinnig, zwischen der 5. und 24. Stunde ist regelmäßig eine Konzentrationserhöhung festzustellen. Dies refraktometrisch gefundene Phänomen bestätigt sich bei interferometrischen Untersuchungen.

Bei Entnahme einer größeren Blutmenge zeigen sich die einzelnen Proben fast ausnahmslos im Konzentrationsgrad verschieden, und zwar sind die letzten Proben durchweg höher konzentriert als die ersten. Ob eine noch so kurze Stauung diese Unterschiede bedingt, oder ob nervöse Einflüsse eine Rolle spielen, kann nicht sicher entschieden werden. Der von *Leendertz* erhobene Befund, daß Plasmaserum von

höherer Eiweißkonzentration sei als Vollblutserum, kann nicht bestätigt werden.

Es wird eine kurze Beschreibung des *Hess*schen Viskosimeters und des *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometers gegeben, sowie eine kritische Würdigung der Eiweißbestimmungen mittels dieser Apparate, besonders der Berechnung der Teilfraktionen des Serums nach *Reiss-Rohrer*.

Wässerige Na-Citratlösungen in aufsteigender Stärke zeigen refraktometrisch in geringer Konzentration eine lineare Kurve, die bei höheren Konzentrationen eine leichte Abbiegung im Sinne eines relativ zu niedrigen Refraktometerwertes aufweist. Das Phänomen wird durch stärkere Ionendissoziation bei starken Verdünnungen erklärt.

Bei Zusatz von 0,2 proz. Na-Citrat zum Vollblut werden refraktometrisch fehlerhafte Plasmawerte gewonnen. Jedoch verhält sich auch beim Salzzusatz zum Serum allein die Erhöhung des Refraktionswertes nicht rein additiv zum Serum. Meist liegt der Salzserumwert unterhalb der berechneten Höhe.

Bei steigendem Na-Citratzusatz zum Serum hält die Viskositätszunahme nicht Schritt mit der Erhöhung der Refraktion, so daß in höheren Konzentrationen bei der Berechnung der Eiweißteilfraktionen nach *Rohrer* eine erhebliche Albuminzunahme vorgetäuscht wird.

Untersuchungen der von *Löhr* angewandten 25proz. Citratlösung bei Zusatz zum Vollblut führen zu dem Ergebnis, daß der in der Refraktion und Viskosität zutage tretende Salzwasserfehler starken Schwankungen unterworfen ist und sich nicht berechnen läßt. Es erscheint nicht sinngemäß, die von *Rohrer* empirisch gefundene Berechnung der Serumteilfraktionen auf das Plasma anzuwenden.

Bei Zusatz einer isotonischen Citratlösung (3,6 proz.) zum Serum scheint die Beeinflussung auf Refraktion und Viskosität ziemlich gleichmäßig zu verlaufen, beim Zusatz derselben zum Blute oder zum Plasma allein treten unterschiedliche Werte in Erscheinung, so daß auch bei dieser Form des Zusatzes zum Blute von einem exakt zu berechnenden Salzwasserfehler nicht gesprochen werden kann.

Bei mangelndem Hirudin erscheint als exakteste Fibrinogenbestimmung auf refraktometrischem Wege die von *Starlinger* angegebene Differenzbestimmung zwischen reinem Plasma und reinem Serum, wobei jedoch vermutlich auch mit einem geringen Minus an Fibrinogen durch die ersten Anfänge der Gerinnung zu rechnen ist.

Literatur.

Adam (s. erste Mitteilung). — *Alder* (s. erste Mitteilung). — *Berger* und *Petschacher* (s. erste Mitteilung). — *Bierich* und *Morawitz* (s. d.). — *M.* und *L. Bleibtreu*, Pflügers Arch. **51**, 1892; **55**, 1894; **60**, 1895. — *Bönninger* und *Hermann*, Klin. Wochenschr. **1923**, Nr. 16. — *Foster* und

Whipple, ref. Ber. über d. ges. Phys. u. Pharm. **18**, 1922. — *Freundlich*, Kapillarchemie und Physiologie, Dresden 1907; Kolloid-Zeitschr. **1**, 1907; Zeitschr. f. phys. Chem. **78**, 1910. — *Gram*, Ber. über d. ges. phys. u. exper. Pharm. **12**, 1922. — *Hafner* und *Kürthy*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **104**, 1924. — *Hekma*, diese Zeitschr. **62/65**, 1914; **73, 74, 77**, 1916. — *Hermann* und *Bönninger* (s. d.). — *Höber* (s. erste Mitteilung). — *Hofmeister*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **25**, 1888; **28**, 1891. — *Kämmerer* und *Waldmann*, Arch. f. klin. Med. **109**, 1913. — *Kossler* und *Pfeiffer* (s. d.). — *v. Krüger*, Zeitschr. f. Biol. **79**, 1923; **81**, 1924. — *Kürthy* und *Hafner* (s. d.). — *Leendertz* (s. erste Mitteilung). — *Leendertz* und *Gromelsky* (s. erste Mitteilung). — *Letsche*, Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. IV, Tl. 3, H. 3, 1923. — *Linzenmeier*, Arch. f. Gyn. **113**, 1920; Zentr.-Bl. f. Gyn. **44**, 1920; Pflügers Arch. **181**, 1920; **186**, 1921. — *Loeb*, Pflügers Arch. **75**, 1900. — *H. Löhr*, Verh. d. 34. Kongr. f. inn. Med. 1922. — *W. Löhr*, 46. Tagung d. deutsch. Ges. f. Chir. 1922; Arch. f. klin. Chir. **121**, 1922; Grenzgeb. d. Med. u. Chir. **34**, 1922; Zentr.-Bl. f. Chir. **35**, 1921; Deutsch. med. Wochenschrift **22**, 1922. — *W.* und *H. Löhr*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **29**, 1922. — *Lossen* und *Morawitz* (s. d.). — *Morawitz*, Ergebn. d. Phys. **4**, 1905; Arch. f. klin. Med. **79**, 1904; Hofmeisters Beitr. **7**, 1906; Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **58**, 1908; Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. IV, Tl. 3, H. 1, 1921.; Oppenheimers Handb. d. Biochem., 2. Aufl., **4**, 1, 1923. — *Morawitz* und *Bierich*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **56**, 1906. — *Morawitz* und *Lossen*, Arch. f. klin. Med. **94**, 1908. — *Müller Fr.* (s. erste Mitteilung). — *Nägeli* (s. erste Mitteilung). — *Nolf*, Ergebn. d. inn. Med. **10**, 1913. — *Pauli*, Kolloid-Zeitschr. **3**, 1908. — *Petschacher*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **36**, 1923; *Wien.* klin. Wochenschr. **48**, 1924. — *Petschacher* und *Berger* (s. erste Mitteilung). — *Pfeiffer*, Zeitschr. f. klin. Med. **33**, 1897. — *Pfeiffer* und *Kossler*, Zentralbl. f. inn. Med. **1**, 1896. — *Raoult*, zitiert nach *Hafner* und *Kürthy*. — *Reiss* (s. erste Mitteilung). — *Rohrer* (s. erste Mitteilung). — *Sano* und *Stuber* (s. d.). — *Schade*, Med. Klinik **29** und **30**, 1909; D. physik. Chem. 1923. — *Schibig* (s. erste Mitteilung). — *Schorer* (s. erste Mitteilung). — *Spiro*, Hofmeisters Beitr. **5**, 1904. — *Starlinger* (s. erste Mitteilung). — *Stuber* und *Sano*, diese Zeitschr. **126**, 1921; **134**, 1922; **140**, 1923 und laufend 1924/25; Verh. d. 34. Kongr. f. inn. Med. 1922. — *Waldmann* und *Kämmerer* (s. d.). — *Whipple* und *Foster* (s. d.).

Über reversible Hämolyse.

Von

L. Bogendörfer u. B. Halle.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Würzburg.)

(Eingegangen am 5. Mai 1925.)

In einer vorläufigen Mitteilung (1) haben wir bereits kurz von unseren Versuchen über reversible Hämolyse berichtet.

Brinkman und *v. Szent-Györgyi* (2) haben kürzlich auf die Tatsache hingewiesen, daß eine Hämolyse reversibel sein kann, womit ausgedrückt sein soll, daß im vollkommen hämolysierten Blute unter bestimmten Bedingungen wieder anscheinend normale rote Blutkörperchen auftreten können, und zwar so zahlreich, daß das Blut wieder das gleiche Aussehen hat wie vor Eintritt der Hämolyse. Die wichtigste Voraussetzung des Auftretens dieses Phänomens ist aber, daß die vorausgegangene Hämolyse lediglich eine Hämoglobinolyse, nicht aber auch eine Stromatolyse war.

Brinkman und *v. Szent-Györgyi* bemerken, daß es merkwürdig sei, daß dieses Rückgängigwerden der Hämolyse nicht allgemein bekannt sei. Sie weisen deshalb auf die Versuche von *Spiro* hin, der das Zurücktreten des Hämoglobins in die Stromata bei Zusatz von Salzlösungen nach hypotonischer Hämolyse beobachten konnte. *Rohonyi* (3) bestätigte im allgemeinen die Befunde *Spiros*, nimmt aber an, daß dieser Vorgang nur bei unvollständig hämolysierten Erythrocyten auftrete. In diesem Falle wären die Erythrocyten bis zur Unsichtbarkeit geschwollen; der Zusatz von Salz bedinge eine Schrumpfung, und dadurch würde das Hämoglobin wieder sichtbar.

Unabhängig von diesen Untersuchungen machten *Adair*, *Barcroft* und *Bock* (4) eine ähnliche Feststellung bei durch Dialyse hämolysiertem Blut. Diese Autoren deuteten diesen Vorgang aber nicht als ein Zurücktreten des von den Erythrocyten weggenommenen Hämoglobins, sondern machen dafür die Aufnahme und den späteren Verlust von Wasser in den Zellen verantwortlich. Eine Beobachtung, die ebenfalls als eine Art von Reversion aufgefaßt werden kann, beschrieb außerdem noch *Rohonyi* (3). Wenn er Blut vollkommen hämolysierte durch Wasser oder Saponin und eine bestimmte Menge einer eiweißfällenden Substanz zusetzte, so fand er, daß das Präzipitat ganz aus Zellen bestand, die ein braunes Hämoglobinderivat enthielten.

Brinkman und *v. Szent-Györgyi* zeigten, daß die Reversion der Hämolyse auch bei vollkommen erfolgter Hämolyse möglich ist, unter verschiedenen Voraussetzungen, von denen die wichtigste die ist, daß die Hämolyse lediglich eine Hämoglobinolyse ist.

Wir haben nun zunächst die Reversion der Hämolyse nach den Angaben von *Brinkman* und *v. Szent-Györgyi* auszuführen versucht und kamen bei diesen Versuchen zum gleichen Ergebnis wie diese.

I.

Die hierbei angewandte *Versuchsanordnung* war folgende: Menschliches, durch Venenpunktion gewonnenes Blut wurde möglichst vorsichtig defibriniert. Durch Zentrifugieren, Abpipettieren des überstehenden Serums und Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung, deren Menge so gewählt wurde, daß immer die gleiche Konzentration, wie sie im frischen Blute bestanden hatte, gewahrt blieb, wurde eine möglichst serumfreie Erythrocytenaufschwemmung gewonnen. Diese solcherweise vorbereiteten Erythrocyten wurden nun hämolysiert durch Hypotonie; es wurde Aqua dest. zugesetzt, und zwar in einer Menge, daß auf 1 ccm Blutkörperchenaufschwemmung ungefähr 1,6 ccm Aqua dest. kamen.

Der Zusatz von Aqua dest. muß ganz langsam erfolgen, ungefähr 1 Minute ließen wir verstreichen bis zu 2 ccm Blutkörperchenaufschwemmung 3,2 ccm Aqua dest. zugegeben waren. Dem vollkommen lackfarbenen Blute wurde nun Kochsalz in Substanz oder hypertonische Salzlösung zugesetzt. Es erweist sich am zweckmäßigsten, die gleiche Menge einer 1,7proz. Kochsalzlösung dem lackfarbenen Blute zuzusetzen, wie Aqua dest. zur Erzielung der Hämolyse verwendet worden war.

Es erfolgte dann prompt ein Verschwinden der Lackfarbe, die Blutkörperchenaufschwemmung wurde deckfarben, die Reversion der Hämolyse trat ein. Wir konnten bei diesen von *Brinkman* und *v. Szent-Györgyi* gemachten Versuchen noch folgendes beobachten: Die Reversion gelingt nicht vollständig oder auch gar nicht, wenn die Hämolyse ganz brüsk ausgeführt wird; durch eine zu rasch eingeleitete Hämolyse erfolgt anscheinend eine Zerstörung oder schwerere Schädigung der Stromata der roten Blutkörperchen. Änderungen in der Form der roten Blutkörperchen ließen sich im mikroskopischen Bilde mitunter erkennen. Die Stromata, aus dem hämolytischen Blute entnommen, sind unter dem Mikroskop schwer sichtbar als matte Scheiben, die sich deutlich von nicht hämolysierten Erythrocyten unterscheiden, nicht wie diese gelbgrünlich leuchten, und die schon bei nur etwas stärkerer Beleuchtung vollkommen unsichtbar werden. Im mikroskopischen Bilde zeigen sich nun die Blutkörperchen nach erfolgter Reversion in der gewöhnlichen Form normaler Erythrocyten; nur fällt mitunter auf, daß zahlreiche Erythrocyten nach erfolgter Reversion stachelförmiges Aussehen aufweisen. Es ist das durchaus keine konstante Eigenschaft im mikroskopischen Bilde der reversierten Erythrocyten, aber doch von einer nicht zu übersehenden Häufigkeit.

II.

Nachdem wir uns von der von *Brinkman* und *v. Szent-Györgyi* angegebenen und in ähnlicher Weise von der Tatsache der reversiblen Hämolyse überzeugt hatten, verfolgten wir die Frage, ob es möglich

sei, *durch Hämolyse frei gewordenes Hämoglobin an andere Stromata zu bringen* als an diejenigen, von denen es durch die Hämolyse frei geworden ist. Mit anderen Worten: Wir versuchten nun eine kombinierte Reversion zu erzielen, d. h. das Stroma des Blutes A mit Hämoglobin vom Blute B zu beladen und umgekehrt.

Voraussetzung für derartige Versuche war, daß es gelang, Hämoglobin und Stromata möglichst scharf zu trennen.

Die Versuchsanordnung hierbei war folgende:

Von den einzelnen Blutproben wurde nach möglichst vorsichtig ausgeführter Defibrinierung zunächst an kleinen Probemengen festgestellt, ein wie geringer Grad von Hypotonie noch eine gut reversible Hämolyse ermöglicht. Es geschah dies deshalb, um bei dem Hauptversuch eine Schädigung der Stromata möglichst zu vermeiden.

Nach reichlich ausgeführter Waschung wurde die Hämolyse ausgeführt wie unter Abschnitt I geschildert. Da es in jedem Blute eine gewisse kleine Anzahl von resistenten Erythrocyten gibt, die bei einem Grad der Hypotonie, der etwa 95 Proz. aller Erythrocyten hämolysiert, nicht ihren Blutfarbstoff abgeben, wurden diese nicht hämolysierten roten Blutkörperchen durch ein kurzes Zentrifugieren zunächst entfernt. Das gleichmäßig hämolysierte Blut wurde dann 4 Stunden lang bei höchster Tourenzahl zentrifugiert. Es setzen sich hierbei die Stromata als Sediment ab. Die überstehende Hämoglobinlösung wurde abpipettiert. Mikroskopische Betrachtung dieser überstehenden Hämoglobinlösung zeigt, daß nur ganz vereinzelte Schatten von Stromatis in ihr vorhanden sind, während das beim Zentrifugieren sich bildende Sediment einen dicken Brei darstellt.

Dieser hier geschilderten Behandlungsweise wurden gleichzeitig zwei Blutproben verschiedener Herkunft unterworfen (A und B).

Es wurde nun zu der Hämoglobinlösung A die Stromata des Blutes B zugegeben und durch vorsichtiges Umschütteln eine gleichmäßige Verteilung erzielt. Das mikroskopische Bild einer derartigen Suspension zeigt nur unter ganz bestimmten günstigen Beleuchtungsverhältnissen die Anwesenheit reichlicher Schattenscheiben. Makroskopisch ist dieses Hämoglobin-Stromagemisch vollkommen lackfarben. Durch Zugabe von 1,7 Proz. Kochsalzlösung, in gleicher Menge wie vorher zur Erzielung der Hämolyse Aqua dest. zugesetzt wurde, trat nun eine deutliche Deckfarbe auf, *die Lackfarbe schlug in die Deckfarbe um.* Unter dem Mikroskop waren nun die vorher kaum sichtbaren Schatten der Stromata in gut kenntliche, gelblich leuchtende Erythrocyten umgewandelt.

Es zeigte sich also, daß das Hämoglobin auch an solche Stromata herangeht, mit denen es vorher in keiner Bindung stand. Diese Versuche gelangen uns regelmäßig mit dem Blute verschiedener Menschen. Wir dehnten unsere Untersuchungen auch dahin aus, *Stromata und Hämoglobin von verschiedenen Tieren zu kombinieren.* Es gelang dies einwandsfrei mit Hunde- und Kaninchenblut und auch mit dem Blute dieser beiden Arten und Menschenblut.

Es galt bei diesen Versuchen, verschiedene Fehlerquellen auszuschalten, deren größte darin beruht, daß die Trennung des Hämoglobins und der Stromata keine absolute ist. Wie hier schon erwähnt, sind in der überstehenden Hämoglobinlösung noch vereinzelte Stromata enthalten. Wenn diese zwar auch nicht zahlreich sind, mußte doch daran gedacht werden, daß die Reversion der Hämolyse, das Deckfarbenwerden der vorher lackfarbenen Lösung zu einem gewissen Grade durch die Anwesenheit der eigenen Stromata bedingt sein kann. Wie hier schon unter Abschnitt I hervorgehoben, gelingt die Reversion nicht, wenn die Hämolyse zu brüsk ausgeführt ist. Wir hämolysierten eine Blutprobe nun derartig, daß eine Reversion mit ihren eigenen Stromatis nicht mehr möglich war. Kombinierten wir nun Hämoglobin, das noch vereinzelte, zunächst nicht abzentrifugierbare Stromata enthielt, an die aber eine Rückkehr des Hämoglobins ausgeschlossen war wegen der Art der brüsk vorgenommenen Hämolyse, mit Stromatis, die durch vorsichtige Hämolyse gewonnen waren, so beluden sich die ungeschädigten, fremden Stromata prompt mit dem Hämoglobin des für sich allein nicht mehr reversiblen Blutes.

Eine zweite Fehlerquelle ist, daß bei den abzentrifugierten Stromatis noch eigenes Hämoglobin dabei ist. Ein Auswaschen des Zentrifugats verringert zu sehr die Menge der Stromata. Trotzdem glauben wir berechtigt zu sein, dem mit dem Stromatis zurückbleibenden Hämoglobin keine Bedeutung bei der kombinierten Reversion zusprechen zu dürfen. Folgende Beobachtung berechtigt uns zu diesem Standpunkt: Wenn man zu dem aus Stromatis und eigenem Hämoglobin bestehenden Bodensatz hypertonische Kochsalzlösung zugibt, in gleicher Menge wie Hämoglobinlösung abpipettiert wurde, so ist das Gemenge zwar nicht mehr ideal lackfarben, aber eine Deckfarbe wie bei der kombinierten Reversion tritt niemals auf.

Noch exakter ließen sich diese Fehlerquellen, die auf der nicht absoluten Trennung von Stromatis und Hämoglobin, die sich übrigens auch durch *de Haën*sche Filter nicht erzielen ließen, ausschalten durch Versuche, in denen wir uns die sogenannte *Pachydermie der roten Blutkörperchen* zu Nutze machtèn.

Auf Grund von Beobachtungen von *Morawitz* und *Pratt* (5) fanden weitere Autoren, unter anderen *Rosenthal* (6), daß bei experimentellen Blutgiftanämien eine besondere Resistenzsteigerung der roten Blutkörperchen erfolgt. Es handelte sich dabei um eine starke Vermehrung der Stromabestandteile. Die Stromata zeigen, besonders unter Phenylhydrazineinwirkung eine wahre Gewichtszunahme und eine Volumenvermehrung. Die Gewichtszunahme der Stromata versprach uns die Möglichkeit, durch die Zentrifuge eine bessere Trennung der Stromata und der Hämoglobinlösung im hämolysierten Blute erreichen zu können.

Wir behandelten deshalb Kaninchen mit Phenylhydrazineinspritzungen vor. Um nicht durch eine zu starke Resistenzvermehrung der Erythrocyten die Reversion der Hämolyse unmöglich zu machen, gingen wir hierbei sehr vorsichtig zu Wege. Wir gaben salzsaures Phenylhydrazin in 1 proz. Lösung in zweitägiger Pause je 1 ccm 14 Tage lang. Wir erhielten auf diese Weise Kaninchenblutkörperchen mit

zwar etwas gesteigerter Resistenz, die aber eine reversible Hämolyse nicht ausschloß; das Stroma der Erythrocyten war deutlich vermehrt. Durch scharfes Zentrifugieren von auf diese Weise vorbehandelten Kaninchenerythrocyten gelang es, eine exakte Trennung der Stromata und der überstehenden Hämoglobinlösung zu erzielen.

Wir konnten bei dieser Gelegenheit auch die von *Rosenthal* gemachte Beobachtung feststellen, daß die Pachydermie der Erythrocyten und die Resistenzvermehrung nicht absolut parallel gehen. Von drei Versuchstieren zeigten zwei zunächst eine deutliche Vermehrung des Gewichts und Größe der Stromata, erkennbar an der Größe des Sediments des zentrifugierten hämolysierten Blutes, während die Resistenz nur wenig zunahm. Die Hämolyse erfolgte bei diesen beiden Tieren vor der Phenylhydrazinbehandlung bei 0,36; nach vier bzw. fünf Einspritzungen trat sie bei 0,32 auf, während die Sedimenthöhe das Dreifache des Ausgangswertes betrug. Beim dritten Kaninchen erfolgte nach viermaliger Injektion von je 1 ccm einer 1 proz. Phenylhydrazinlösung die Hämolyse erst bei 0,28, während die Zunahme des Sediments nur eine geringfügige war.

Eine Pachydermie in vitro zu erzielen, wie *Rosenthal* angegeben, ergab für unsere Zwecke keine befriedigenden Ergebnisse.

Es gelang uns somit, eine exakte Trennung von Stromatis und Hämoglobin zu erzielen bei Blut, bei dem eine reversible Hämolyse möglich war. Durch Kombination solcherweise gewonnener, stromatafreier Hämoglobinlösungen mit anderen Stromatis, von Menschen z. B., gelang ebenfalls die reversible Hämolyse, so daß keine Bedenken wegen Versuchsfehler an unserer Beobachtung nötig sind.

III.

Es gelingt also einwandsfrei, an Stromata fremdes Hämoglobin heranzubringen, so daß makroskopisch wie mikroskopisch normale Blutkörperchen vorzuliegen scheinen.

Unser weiteres Bestreben war nun, Näheres über *die Eigenschaften dieser künstlichen Erythrocyten* in Erfahrung zu bringen. Zunächst beschäftigten wir uns mit Untersuchungen darüber, wie fest diese neue Verbindung des Hämoglobins mit dem Stroma ist, und wählten als Maßstab dafür den Grad einer hypotonischen Lösung, der das Hämoglobin wieder vom Stroma trennt.

In einer Versuchsreihe wurde die Resistenz der Erythrocyten von sechs verschiedenen Menschen untersucht und festgestellt, bei welcher Hypotoniestärke Hämolyse auftritt. Je eine geringe Menge der gleichen Blutproben wurde hämolysiert, und durch Zusatz von hypertonischer Kochsalzlösung wurde die eingetretene Hämolyse wieder rückgängig gemacht. (Die Methode dieser Versuche war die unter I. eingehend beschriebene.) Von diesem reversierten Blute wurden dann die gleichen Mengen, wie zur Resistenzbestimmung des früheren Blutes verwendet worden waren, in eine Reihe von Kochsalzlösungen mit fallender Konzentration gegeben. Es zeigte sich nun, daß die reversierten roten

Blutkörperchen das Hämoglobin erst in Kochsalzlösungen abgaben, deren Konzentration eine viel geringere war als die Lösungen, in denen die Hämolyse der frischen Erythrocyten erfolgte.

Fall	I	II	III	IV	V	VI
Frisches Blut	0,30	0,32	0,30	0,34	0,32	0,32
Reversiertes Blut	0,10	0,14	0,12	0,12	0,14	0,10

Die Resistenzbestimmungen wurden in der Weise ausgeführt, daß 0,1 ccm Blut mit 2 ccm der verschieden konzentrierten Kochsalzlösungen zusammen gegeben wurden. Wir bestimmten immer die untere Resistenzgrenze, d. h. die Maximumresistenz.

Wir fanden somit, *daß die reversierten roten Blutkörperchen bedeutend resistenter sind als die nicht vorbehandelten.* In unseren Versuchen war insofern eine Verschiedenheit in der Anordnung, als die Konzentration der Erythrocyten im frischen Blute eine größere war als bei den reversierten Blutkörperchen. Die Zahl der reversierten Erythrocyten ist durch die zur Erzielung der Reversion nach erfolgter Hämolyse zugesetzte hypertonische Kochsalzlösung entsprechend kleiner als in der gleichen Menge Blut. Es wurden deshalb auch die Resistenzversuche mit Blut ausgeführt, das durch Zusatz von isotonischer Kochsalzlösung verdünnt war, so daß es hinsichtlich der Zahl der in ihm enthaltenen Erythrocyten der Aufschwemmung der reversierten Erythrocyten entsprach. Der Unterschied in der Resistenz gegen hypotonische Lösungen der frischen und der reversierten Erythrocyten blieb der gleiche.

Da bei den reversierten Erythrocyten kein Serum anwesend war, so mußte noch festgestellt werden, welchen Einfluß beim frischen Blute die Anwesenheit des Blutserums auf den Resistenzversuch hat. Es wurde darum auch die Resistenz gewaschener roter Blutkörperchen festgestellt und verglichen mit ungewaschenen. Wir fanden, was auch *Nägeli* in seinem Lehrbuch erwähnt, daß die Abwesenheit des Serums die Hämolyse etwas erleichtert, aber in einem ganz geringen Grade. Als Beispiel folgender Versuch:

Blut A (ungewaschen) hämolysiert bei 0,32 Proz.
„ A (gewaschen) „ „ 0,30 „
„ A (reversiert) „ „ 0,10 „

Es kann somit für die gesteigerte Resistenz der reversierten Erythrocyten nicht die Abwesenheit des Serums als wesentliche Ursache in Betracht kommen.

Wir stellten auch Untersuchungen an, ob die Länge der Zeit nach Entnahme des Blutes aus dem Körper von Einfluß auf die Resistenz und auf die Möglichkeit der Rückgängigmachung der Hämolyse ist. Wir fanden, daß während 9 Tagen sich keine Änderung in der Resistenz

bei den einzelnen Blutproben bemerkbar macht und daß auch während dieser Zeitspanne die Reversion möglich ist.

IV.

In den bisher geschilderten Versuchen konnte beobachtet werden, daß die Resistenz der Blutkörperchen, nachdem die Hämolyse rückgängig gemacht worden war, eine größere ist als vorher. Es interessierte nun zu untersuchen, wie sich die Resistenz solcher Blutkörperchen gestaltet, bei denen eine kombinierte Reversion ausgeführt worden ist, die sich aus Stroma und Hämoglobin verschiedener Herkunft zusammensetzen (s. Abschnitt II).

Es wurde zunächst die Resistenz des frischen Blutes von zwei verschiedenen Spendern untersucht (A und B). Sie betrug beidemal 0,32. Beide Blutproben wurden dann hämolysiert durch Zugabe von 6 ccm Aqua dest. zu 3 ccm defibriniertem Blute. Das hämolysierte Blut wurde dann 4 Stunden lang zentrifugiert bei einer Tourenzahl von 3000 pro Minute. Die über den als Bodensatz abgesetzten Stromatis stehende Hämoglobinlösung wurde abpipettiert. Das Hämoglobin des Blutes A wurde mit Stromatis des Blutes B und umgekehrt zusammengebracht. Nach Zugabe von je 3,5 ccm einer 1,7 proz. NaCl-Lösung verschwand die Lackfarbe des Gemisches, und es war deutliche Deckfarbe festzustellen. Nun wurde die Resistenz dieser neuen Erythrocyten bestimmt. In beiden Fällen trat erst bei einer Kochsalzkonzentration von 0,12 Proz. Hämolyse auf. Ein derartiges Verhalten der roten Blutkörperchen trat in sechs analog durchgeführten Versuchen gleichmäßig in Erscheinung. Wir stellten die gleichen Versuche auch mit Hundeblut an, dessen Erythrocyten durch Vorbehandlung des Tieres mit Phenylhydrazin pachydermisch gemacht worden waren.

Als Beispiel folgender Versuch:

Menschenblut	(M)	hämolysiert bei	0,34 Proz.
Hundeblut	(H)	,, ,,	0,30 ,,

Blutkörperchen aus Stroma M und Hämoglobin H hämolysiert bei 0,14 Proz. *Es verhalten sich also in dieser Hinsicht die aus Stroma und Hämoglobin verschiedener Herkunft zusammengesetzten Erythrocyten ebenso wie Erythrocyten nach erfolgter reversierter Hämolyse.*

V.

Des weiteren stellten wir Versuche an, durch refraktometrische Bestimmungen die Verschiebung des Hämoglobins bei der einfachen und bei der kombinierten Reversion der Hämolyse zu kontrollieren. Zunächst stellten wir unsere Beobachtungen in der Weise an, wie die Beschreibung des folgenden Versuchs erhellt:

Hundeblut wurde durch Vorbehandlung mit Injektionen von Phenylhydrazin in vivo pachydermisiert (über die Technik s. Abschnitt II). In dem defibrinierten Blute wurde dann die Resistenz der Erythrocyten

bestimmt. Es wurde durch Zentrifugieren das Serum entfernt, die Hämolyse eingeleitet und durch langes und scharfes Zentrifugieren die Stromata von der Hämoglobinlösung getrennt. Um in dem Stromasediment noch befindliches Hämoglobin zu entfernen, wurden die Stromata nochmals mit einer ganz schwach hypotonischen Kochsalzlösung gewaschen; durch langes Zentrifugieren gelingt es, die pachydermischen Stromata wieder zu sedimentieren. Damit in der abpipettierten Hämoglobinlösung sicher keine Stromata erhalten bleiben können, wurden der Hämoglobinlösung einige Tropfen konzentrierte Kochsalzlösung zugesetzt, so daß allenfalls in ihr erhaltene Stromata nach dem Vorgang der reversiblen Hämolyse sich mit Hämoglobin beladen. Durch Zentrifugieren der mit wenigen Tropfen Kochsalzlösung versetzten Hämoglobinlösung wurden auch die letzten in ihr enthaltenen Stromata in Form reversierter Erythrocyten entfernt, so daß wir eine reine Hämoglobinlösung vor uns hatten.

Von dieser Hämoglobinlösung bestimmten wir die Refraktion, ebenso vom Stromasediment. Daraufhin wurden die gewaschenen Stromata der Hämoglobinlösung, die hypertonisch war, zugesetzt. Makroskopisch zeigte sich ein Verschwinden der Lackfarbe und das Auftreten der Deckfarbe. Mikroskopisch zeigten sich die Stromata, die vorher als undeutlicher Schatten kaum kenntlich waren, jetzt plötzlich als deutlich sichtbare, grünlich-gelb gefärbte Erythrocyten.

Die reversierte Aufschwemmung wurde nun zentrifugiert und so die reversierten Erythrocyten sedimentiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde wieder refraktometrisch bestimmt.

Die in drei verschiedenen Versuchen gewonnenen Refraktionswerte sind folgende:

Hämoglobinlösung allein 55,0, 47,3, 52,3 Proz.; Hämoglobinlösung nach Zugabe der Stromata 44,6, 40,5, 43,5 Proz.

Es wurde auch refraktrometrisch untersucht, ob die Werte der Stromaaufschwemmungen Änderungen aufweisen durch Zusatz hypo- und hypertonischer Kochsalzlösungen. Es waren aber hierbei weder refraktometrisch, noch makroskopisch und mikroskopisch Unterschiede festzustellen.

Entsprechend dieser Versuchsanordnung bei einfacher Reversion stellten wir auch bei kombinierter Reversion diese Beobachtungen an. Wir verwandten pachydermisierte Hundestromata und Hämoglobin von Menschenblut. Die Hämoglobinlösung wurde durch Zusatz von konzentrierter Kochsalzlösung und Zentrifugieren stromafrei gemacht. Auch bei diesen Versuchen läßt sich refraktometrisch die Hämoglobinbewegung einwandsfrei feststellen. Die gefundenen Werte sind:

Menschliche Hämoglobinlösung allein 58,0, 56,5 Proz.; nach Zugabe von Hundeblutstromatis 50,3, 47,3 Proz.

Diese refraktometrischen Untersuchungen bestätigen, wie wir makroskopisch und mikroskopisch feststellen konnten, daß eine kombinierte reversible Hämolyse, d. h. eine Bindung von Hämoglobin an Stromata verschiedener Herkunft möglich ist. Wir versuchten nun auch die Möglichkeit, ob es gelingt, einen anderen Eiweißkörper als Hämoglobin an Stromata in ähnlicher Weise heranzubringen, und wählten dazu Casein. Refraktometrische Untersuchungen einer Caseinlösung vor und nach Zugabe von Stromatis in verschieden tonischen Lösungen ergaben aber keine nachweisbaren Unterschiede.

Unsere Untersuchungen haben zunächst die von *Brinkman* und *v. Szent-Györgyi* mitgeteilten Beobachtungen bestätigt. Daß es uns auch gelungen ist, eine Kombination zwischen Hämoglobin und Stroma verschiedener Herkunft zu erzielen, ist ein weiterer Beweis für die Möglichkeit der reversiblen Hämolyse. Durch die Möglichkeit der Umkehr der Hämolyse werden wichtige Fragen über den Bau der Erythrocyten berührt, besonders für die Art der Haftung des Hämoglobins an das Stroma können vielleicht Anhaltspunkte gewonnen werden. Ob es sich um eine Adsorption handelt, so daß das Hämoglobin durch Oberflächenkräfte am Stroma festgehalten wird, oder ob es in das Stroma wie in eine Blase eingeschlossen ist, mit einer dieser beiden Theorien wäre das Phänomen der reversiblen Hämolyse in Einklang zu bringen.

In einer in allerjüngster Zeit erschienenen Arbeit hat *E. L. Bayliss* (7) seine Untersuchungen über reversible Hämolyse veröffentlicht. Er widerspricht dabei sehr energisch der Theorie der Adsorption, die *Brinkman* für die wahrscheinlichste hält und die zweifellos durch die Möglichkeit der Umkehr der Hämolyse an Wahrscheinlichkeit gewinnt. *Bayliss* steht nun auf dem Standpunkt, daß das Phänomen der reversiblen Hämolyse ein osmotischer Vorgang ist. Er erkennt zwar die äußere Erscheinung der reversiblen Hämolyse an, glaubt aber diesem Phänomen einen ganz anderen Vorgang zugrunde legen zu müssen als es *Brinkman* tut. Und zwar vertritt *Bayliss* die Auffassung, daß eine wirkliche Hämolyse bei dem Zusatz von hypotonischen Lösungen gar nicht immer auftrete und daß sich das Blut verschiedener Menschen hierbei verschieden verhalte. Er teilt die Blute, die das Phänomen der Reversion aufweisen, in zwei Klassen ein, die jedoch ziemlich weitgehend ineinander übergehen, wobei er zugibt, daß die Schwellungstheorie zur Erklärung der Vorgänge bei Hämolyse nicht in ihrem ganzen Umfang aufrecht erhalten werden kann. Die eine Klasse, die *Bayliss* aufstellt, ist dadurch gekennzeichnet, daß bei ihr durch Zusatz von hypotonischen Lösungen keine eigentliche Hämolyse stattfindet, sondern daß hier eine starke Schwellung der Blutkörperchen eintritt, so sehr, daß diese fest aneinander gedrängt sind. Dadurch wird das makroskopische Aussehen verändert in der Richtung des Lackfarbenwerdens, aber eine völlige Durchsichtigkeit tritt nicht ein. Bei der Reversion dieses Zustands würde nach *Bayliss* eine Rückkehr der Blutkörperchen zu ihrer normalen Größe eintreten.

Bei der zweiten Klasse von Blut, die *Bayliss* aufstellte, ist das Hämoglobin tatsächlich ausgetreten, „herausgeschafft worden" aus den Blutkörperchen infolge der übermäßigen Schwellung der Körperchen; dabei sei das Stromamaterial nicht aufgelöst worden, sondern behalte seine Struktur. Diese Präparate sind vollständig durchsichtig

und nicht zu unterscheiden von vollständig hämolysiertem Blute, wo Hämolyse und Stromatolyse erfolgt sei. Nach Einleitung der Reversion in diesen Fällen tritt ebenfalls eine Schrumpfung der geschwollenen Körperchen ein, sie nehmen ihre ursprüngliche Größe wieder an. Ihr Hämoglobingehalt sei jetzt aber nur unbedeutend größer als in der die Körperchen enthaltenden Flüssigkeit. *Bayliss* nimmt aber doch an, daß bei der Schrumpfung der Stromata diese einen gewissen Betrag von Hämoglobin an sich reißen. Als Wesentliches bei dem sogenannten Phänomen der reversiblen Hämolyse bezeichnet *Bayliss* aber doch das Schwellen und Schrumpfen der Erythrocyten und lehnt die Notwendigkeit der Annahme einer Adsorption des Hämoglobins an die Stromata ab.

Als Methoden bei seinen Untersuchungen dienten *Bayliss* Mikroskop, Hämatokrit, Refraktometer und Viskosimeter.

Unsere Ansicht, zu der wir auf Grund unserer eigenen Versuche kommen, ist nun folgende:

Eine Schwellung und Schrumpfung der Erythrocyten mag sehr wohl bei dem Vorgang der reversiblen Hämolyse in einem gewissen Grade auftreten und kann vielleicht auch eine Rolle bei dem sich hierbei abspielenden Prozeß haben. Den Hauptfaktor jedoch bilden Schwellung und Schrumpfung nicht. Durch unser Verfahren, pachydermisch gemachte Blutkörperchen zu verwenden, gelang zweifellos die Trennung von Hämoglobin und Stroma in weitgehendstem Maße. Daß Reste von Hämoglobin zwischen den Stromatis nach dem Abzentrifugieren für das Zustandekommen der Reversion keine Rolle spielen können, ergaben unsere refraktometrischen Untersuchungen. Vielmehr läßt sich mit dieser Methode nachweisen, daß etwa 60 Proz. des Hämoglobins an die Stromata herangeht. Verwendet man nun Hämoglobin und Stromata verschiedener Herkunft, wie wir es getan, so kann an Vorgänge, wie sie *Bayliss* bei Blut seiner ersten Klasse beschreibt, gar nicht gedacht werden. Benutzt man noch die Vorsichtsmaßnahme, die bei Verwendung pachydermisierter Erythrocyten zweifellos geringe Anzahl von Stromatis bzw. besonders resistenter Erythrocyten durch Hypertonie aus der Hämoglobinlösung auszuschalten, und kombiniert dann diese stromafreie Hämoglobinlösung mit Stromasediment, in dem durch Hypertonie auch keine Änderung des Aussehens der Stromata zu erzielen war, dann ist man wohl berechtigt, Schwellungs- und Schrumpfungsprozessen eine untergeordnete Bedeutung beizumessen und Adsorptionsvorgänge in den Vordergrund der Erscheinung zu stellen.

Vielleicht darf man auch unsere Befunde bei der Resistenzbestimmung der reversierten Erythrocyten als Stütze der Adsorptionstheorie anführen. Wie wir fanden, ist die Resistenz der reversierten

Erythrocyten eine größere als die der gleichen Blutkörperchen vor der Hämolyse und Reversion. Da nach der Reverison nur etwa 60 Proz. des Hämoglobins, was auch *Brinkman* feststellen konnte, an oder in den reversierten Blutkörperchen enthalten sind, so können die Oberflächenkräfte des Stromas diese Menge Hämoglobin fester halten, und die Resistenz ist somit eine stärkere. Als Grund gegen die Adsorptionstheorie führt *Bayliss* noch an, von teleologischen Erwägungen ausgehend, die Menge des Hämoglobins auf der Oberfläche verteilt, würde eine genügend schnelle Diffusion des Sauerstoffs bei der dann notwendigen Dicke der Hämoglobinschicht nicht zulassen. Es besteht aber wohl die Möglichkeit, daß die durch adsorptive Kräfte bedingte Fixierung des Hämoglobins ans Stroma nicht nur an dessen Oberfläche wie an eine Kugel statthat, sondern daß im Stroma wie in einem Schwamme, das Hämoglobin in verhältnismäßig dünner Schicht angelagert ist.

Zusammenfassung.

Das von *Brinkman* und *v. Szent-Györgyi* beschriebene Phänomen der reversiblen Hämolyse ließ sich von uns bei jedem Blute auslösen. Es gelingt, Hämoglobin und Stroma verschiedener Herkunft, sogar von verschiedenen Tierspezies stammend, zu kombinieren, also eine kombinierte reversible Hämolyse auszuführen.

Die reversierten roten Blutkörperchen sind hypotonischen Lösungen gegenüber bedeutend resistenter als sie vor Hämolyse und Reversion waren.

Es läßt sich refraktometrisch die Hämoglobinverschiebung au einer Hämoglobinlösung an fremde Stromata feststellen.

Die gemachten Beobachtungen sprechen im Sinne einer Adsorption des Hämoglobins an das Stroma. Die Theorie, durch Schwellung und Schrumpfung der Erythrocyten die reversible Hämolyse zu erklären, wird besonders auf Grund der bei der kombinierten reversiblen Hämolyse gemachten Feststellungen nicht für ausreichend erachtet.

Literatur.

1) *Bogendörfer* und *Halle*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 46. — 2) *Brinkman* und *A. v. Szent-Györgyi*, Journ. of Physiol. **58**, 2 und 3. — 3) *Rohonyi*, Kolloidchem. Beihefte 8, 391, 1916. — 4) *Adair*, *Barcroft* and *Bock*, Journ. of Physiol. **50**, 1921. — 5) *Morawitz* und *Pratt*, Münch. med. Wochenschr. 1908, S. 1816. — 6) *Rosenthal*, Folia haemat. **10**, 253. — 7) *L. E. Bayliss*, Journ. of Physiol. **59**, Nr. 1.

Joddüngung und Jodfütterung. I.

Von

Th. von Fellenberg.

[Orientierender Versuch des eidgenössischen Gesundheitsamtes und der Zentralverwaltung der schweiz. landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsanstalten Liebefeld[1])].

(Eingegangen am 11. Mai 1925.)

J. Stoklasa[2]) berichtete vor einiger Zeit über Joddüngungsversuche mit Zuckerrüben. Er untersuchte Pflanzen aus verschiedenen Familien auf ihre Jodempfindlichkeit. Während z. B. Gramineen durch eine Lösung von 5 mg Jod in Form von Kaliumjodid im Liter nach 22 Tagen, Papilionaceen nach 45 Tagen zugrunde gehen, halten andere Pflanzen größere Jodmengen ohne Schaden aus. Die Halophyten, zu welchen die Zuckerrübe gehört, werden nach *Stoklasa* durch Joddüngung sogar in ihrem Wachstum gefördert, wie folgende Versuche zeigen.

Die Rüben wurden in Töpfen zu 12 kg Erde mit 21 mg Jod in Form von KJ pro Topf versetzt und ergaben als Ernte:

	Ohne Joddüngung g	Mit Joddüngung g
Blätter	2066	2246
Wurzeln	1390	1989

Der Jodgehalt der Produkte pro Kilogramm Trockensubstanz war folgender. Wir geben die Werte in Gamma = 0,001 mg an.

	Ohne Joddüngung γ J im kg	Mit Joddüngung γ J im kg
Blätter	320	900
Wurzeln	150	600

[1]) Die Kultur- und Fütterungsversuche wurden auf dem Gutsbetrieb Liebefeld durch die Zentralverwaltung der schweizerischen landwirtschaftlichen Versuchsanstalten, die Jodbestimmung im Laboratorium des eidgenössischen Gesundheitsamtes durch *Th. von Fellenberg* vorgenommen. Die Untersuchung einer Anzahl Milchproben verdanken wir der schweizerischen milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt Liebefeld.

[2]) *J. Stoklasa*, C. r. 128, 120, 1924.

Folgende Resultate ergab ein Feldversuch, wobei die mit Jod gedüngten Parzellen 1,72 kg Jod in Form von K J pro Hektar erhielten. Man erntete pro Hektar:

	Ohne Joddüngung dz	Mit Joddüngung dz
Blätter	374	405
Wurzeln	333	413

Unsere Versuche bezweckten nun, einen Feldversuch in ähnlicher Weise wie *Stoklasa*, und zwar nicht mit Zuckerrüben, sondern mit Runkelrüben durchzuführen und den Einfluß der Verfütterung der geernteten Blätter und Wurzeln auf den Milchertrag von Kühen und auf die Zusammensetzung der Milch, besonders in bezug auf ihren Jodgehalt, festzustellen. Man konnte sich fragen, ob es nicht aussichtsreich wäre, dem Menschen die kleinen Jodmengen, welche er täglich nötig hat, durch eine auf dem natürlichsten Wege etwas jodreicher gewordene Milch zuzuführen.

1. Düngungsversuch.

Boden: sandiger Lehm.

Runkelrübensorte: Schöne von Andelfingen (schweizerische Züchtung).

Aussaat: am 6. Mai 1924 auf sechs Parzellen von 50 qm. Reihenabstand: 50 cm; Abstand der Pflanzen in den Reihen: 35 cm.

Grunddüngung: je Hektar für alle Parzellen gleich:

847,5 dz Stallmist,
50 kg P_2O_5 in Form von Superphosphat,
100 kg K_2O in Form von 30proz. Kalisalz.

Differenzdüngung:

Parzellen I: ohne Ammoniumsulfat, ohne Jod.
„ II: 60 kg N je Hektar als Kopfdüngung in Form von 20proz. Ammoniumsulfat, ohne Jod.
„ III: wie II, dazu 2,0 kg Kaliumjodid je Hektar.

Pflege:

12. Juni: hacken.
27. Juni: hacken und jäten.
1. Juli: ausdünnern und nachpflanzen.
8. Juli: Kopfdüngung mit Ammoniumsulfat (II und III) und Jod (III); hacken.
10. Juli: jäten.

Verlauf des Versuchs.

19. Mai: Starkes Hagelwetter. Unregelmäßige Keimung der Samen. Die Parzellen wiesen bis zum 1. Juli, wo ausgedünnert und nachgepflanzt wurde, einen ziemlich lückigen Bestand auf.

22. Juli: Starker Platzregen; eine daherige Verschwemmung der Differenzdüngung schien selbst auf dem ebenen Versuchsland im Bereich der Möglichkeit zu liegen. Die Parzellen mit Ammoniakdüngung (II und III) zeichneten sich deutlich durch üppigere Blattentwicklung mit dunkelgrünen

Blättern gegenüber den nicht mit Ammoniak gedüngten Parzellen aus. Bei den Rüben konnte ein Unterschied nicht festgestellt werden.

Am 7. Oktober fand die Ernte statt. Das Ergebnis ist in der Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I.

Ernteergebnis.

Parzellen	Ertrag je Parzelle in kg		Ertragsmittel in kg pro a oder in dz je ha			Prozentischer Vergleich der Erträge
	Runkeln kg	Blätter kg	Runkeln	Blätter	Runkeln und Blätter	
Ia	445	121				
Ib	482	101				
Ic	518	109				
Total	1445,0	331,0	963,3	220,7	1184,0	100
IIa	495	161				
IIb	475	124				
IIc	540	125				
Total	1510,0	410,0	1006,7	273,3	1280,0	108,1
IIIa	460	140				
IIIb	512	131				
IIIc	497	129				
Total	1469,0	400,0	979,3	266,7	1246,0	105,2

Eine Ertragsverbesserung scheint sowohl bei den Runkeln als auch bei den Blättern bei den Parzellen II und III infolge Ammoniakdüngung eingetreten zu sein. Die Abweichungen bei den Runkeln liegen aber innerhalb der Fehlergrenze, so daß hier von einer Wirkung nicht die Rede sein kann. Außerhalb der Fehlergrenze liegen die Mehrerträge bei den Blättern, wo eine deutliche Wirkung der Ammoniakdüngung eingetreten ist. Die Differenzdüngung mit Kaliumjodid war unwirksam, im Gegensatz zu den Befunden von *Stoklasa.*

Die *chemische Untersuchung* erstreckte sich auf die Jodbestimmung im Boden vor Verabfolgung der Joddüngung und zur Zeit der Ernte, ferner in den Düngemitteln und schließlich in den geernteten Rüben und Blättern.

Man suchte zu berechnen, wieviel von dem den Pflanzen zur Verfügung stehenden Jod von denselben im Laufe der Vegetationsperiode aufgenommen worden ist. Zu den genannten Jodquellen kommt noch das durch den Regen auf die Erde gelangende Jod hinzu.

Die Erdproben werden mit Hilfe eines Probestechers bis zu 15 cm Tiefe entnommen. Je zehn Proben wurden pro Parzelle zu 50 qm ausgehoben.

Um die Verhältnisse zu vereinfachen, mischte man die vor der Joddüngung gefaßten Proben aller Parzellen. Ferner wurden die bei der Ernte erhobenen Muster der Parzellen I und II vereinigt. Die Unter-

suchungsmethode, wie sie früher[1]) für Erde beschrieben worden ist, befriedigte uns in diesem Falle nicht. Man durfte sich nicht mit einer Bestimmung des Gesamtjods begnügen, da ja die Hauptmenge des in den Gesteinen und in Erde enthaltenen Jods für die Pflanzen nicht verwertbar ist. Auch das in HCl lösliche Jod kam hier weniger in Betracht, da unsere Erde mit Salzsäure überhaupt nicht aufbraust. Man ging deshalb so vor.

1. Man bestimmte das Jod im wässerigen Auszug der Erde. Von der feuchten, in Stöpselflaschen aufbewahrten Erde wird so viel abgewogen, wie 25 g trockener Erde entspricht. Man setzt 250 ccm Wasser zu, läßt während 1 Stunde unter häufigem Umschütteln stehen, filtriert und bestimmt das Jod im Filtrat.

2. Jodbestimmung im Auszug mit 1proz. Kochsalzlösung. Von Dr. *Truninger* wurden wir darauf aufmerksam gemacht, daß das Jod sich vielleicht weitgehend durch Ionenaustausch unter Verwendung eines Alkalihalogenids würde verdrängen lassen. Neue Erdproben von 25 g Trockensubstanzgehalt wurden mit der zehnfachen Menge 1proz. Lösung von umkristallisiertem, jodfreiem Kochsalz 1 Stunde geschüttelt, dann filtriert und das Filtrat verarbeitet.

3. Jodbestimmung im Pottascheauszug. Pottasche wurde bereits durch *Chatin* bei der Jodbestimmung in Erden verwendet.

Die 25 g Trockensubstanz entsprechenden Proben werden in gewogenen Bechergläsern mit 250 ccm Wasser und 2,5 ccm gesättigter Pottaschelösung im siedenden Wasserbade $1\frac{1}{2}$ Stunden lang erhitzt, indem man von Zeit zu Zeit umrührt. Dann wird das verdampfte Wasser durch frisches ersetzt. Nach dem Erkalten filtriert man und bestimmt das Jod in einem gemessenen Teil des Filtrats.

4. Salzsäurelösliches Jod in der mit Pottasche ausgezogenen Erde. Man spült die auf dem Filter befindliche Erde wieder in das Becherglas zurück, verdünnt mit im ganzen 400 ccm Wasser und läßt bis am nächsten Tage absitzen. Dann gießt man die annähernd klare Lösung ab und versetzt die zurückbleibende, feuchte Erde mit 5 ccm HCl (1 : 1), welche zur Verhütung von Oxydationen im Liter mit 2 g Natriumbisulfit versetzt worden ist. Man läßt einige Stunden stehen, verdünnt mit Wasser auf 125 g. filtriert und bestimmt das Jod in einem gemessenen Teile des Filtrats.

5. Jodbestimmung im unlöslichen Rückstand. Der Rückstand von der Salzsäurebehandlung wird gründlich ausgewaschen, getrocknet, fein verrieben und in einem Teil davon das Jod nach Aufschließen mit KOH bestimmt.

Man erhielt folgende Werte:

---

1) Diese Zeitschr. 152, 121, 1924.

Tabelle II.
Jodgehalte der Erdproben.

	Vor der Joddüngung, 2. Juni. Parzelle I, II u. III	Bei der Ernte, 6. Oktober	
		Parzelle I u. II	Parzelle III
	γ J im kg	γ J im kg	γ J im kg
Wässeriger Auszug	10	15	30
1 proz. NaCl-Lösung	12	8	10
Pottascheauszug	880	810	1500
HCl-Lösung nach Pottascheauszug	72	105	100
Im Rückstand, fest gebundenes Jod	1250	870	1000
Gesamtjod	2202	1785	2600

Diese Zahlen haben nicht alle dieselbe Genauigkeit. Die vier ersten Zahlenreihen wurden mit 25 g, also einer ziemlich großen Materialmenge ausgeführt, das fest gebundene Jod im Rückstand hingegen nur mit 2 g, wie dies in der Methode begründet liegt. Deshalb kommen von letzteren Zahlen nur die beiden ersten Ziffern in Betracht. Wir sehen nun bei diesem fest gebundenen Jod große Differenzen, die außerhalb der Fehlergrenze liegen. Den höchsten Wert zeigt die Erde vor der Joddüngung, den niedrigsten diejenige der Parzellen I und II nach der Düngung. Diese Differenzen sind auf Ungleichheiten in der Erde selbst zurückzuführen, bzw. auf die Schwierigkeit, bei dem vorliegenden Material wirklich genaue Durchschnittsproben zu erlangen. Das fest gebundene Jod hat übrigens für unsere Betrachtungen nur untergeordnetes Interesse.

Wir sehen, daß sowohl Wasser als auch 1 proz. Kochsalzlösung nur äußerst geringe, unter sich ähnliche Jodmengen aus der Erde herauslösen. Da die Kochsalzlösung nicht besser wirkt als destilliertes Wasser, kann man also hier nicht von einer speziellen Ionenwirkung der ersteren reden.

Durch die Joddüngung hat sich das wasserlösliche Jod nur um ein geringes, das pottaschelösliche hingegen ganz beträchtlich vermehrt. Es hat um 600 bis 700 γ pro Kilogramm zugenommen. Es ist nun nicht einzusehen, daß sich das zugesetzte Jodid als solches weder in Wasser, noch in Kochsalzlösung, wohl aber in Pottaschelösung lösen sollte. Es liegt viel näher, anzunehmen, daß es sich im letzteren Falle nicht mehr um anorganisches Jodid, sondern um organisches, an Düngstoffe und Humus gebundenes Jod handelt.

Es ist nun interessant, sich darüber Rechenschaft zu geben, wieviel von dem bei der Düngung verwendeten Jod zur Zeit der Ernte noch im Boden vorhanden ist. Pro Quadratmeter sind 0,2 g oder 200000 γ Kaliumjodid ausgebracht worden. Wenn wir die in Betracht kommende Tiefe auf 20 cm und das spezifische Gewicht der Erde auf

1,5 veranschlagen, so entsprechen einem Quadratmeter Oberfläche 300 kg Erde. Damit wären in 1 kg Erde 667 γ KJ oder 510 γ Jod hineingebracht worden.

Wir hätten also eine größere Jodzunahme gefunden, als dem zugesetzten Jod entspricht. Natürlich sind die Fehlerquellen bei einer solchen Berechnung ganz beträchtliche. Schon die gleichmäßige Verteilung des Jods in der Erde durch Diffusion muß in dem Maße gehemmt werden, als das Jodid in die unlösliche organische Form übergeführt wird. Immerhin scheint aus unseren Untersuchungen hervorzugehen, daß keine größeren Jodverluste eingetreten sind, daß sich das eingebrachte Jod zur Zeit der Ernte noch größtenteils in der Erde befindet.

Die Erde der Versuchsanstalt Liebefeld, hervorgegangen aus dem diluvialen Schotter der letzten Eiszeit, zeichnet sich durch eine bedeutende katalytische Wirkung aus[1]), d. h. die Erde oxydiert zugesetztes Jodid leicht zu elementarem Jod. Es ist nun die Möglichkeit vorhanden, daß das frei werdende Jod teilweise in die Luft entweicht; es kann auch teilweise durch den Regen ausgewaschen werden und in das Grundwasser gelangen. Ein Teil hingegen, und in unserem Falle muß dies weitaus die Hauptmenge ausmachen, wird durch die organischen Substanzen des Bodens gebunden und in praktisch unauswaschbarer Form festgehalten. Je mehr Düngstoffe zugegen sind, desto ausgiebiger kann diese Bindung erfolgen. Unser gut gedüngter Boden scheint hier recht gründlich gewirkt zu haben.

Versuchen wir nun zu berechnen, wieviel Jod jeder einzelnen Pflanze durch die Joddüngung in greifbarer Form zur Verfügung stand und wieviel von dem zur Verfügung stehenden sie aufgenommen hat.

Auf je 100 qm kommen 574 Pflanzen. Die Tabelle III gibt die Jodgehalte der Düngemittel an und die Jodmenge, welche jeder Pflanze dadurch zukommt.

Tabelle III.

	Jodgehalte der Düngemittel γ pro kg	Menge der Düngemittel je Pflanze g	Jeder Pflanze stehen daraus zur Verfügung γ J
Stallmist[2])	40	1480	59,2
Thomasmehl[3])	360	0,75	0,27
Kalisalz[3])	440	1,63	0,72
Ammonsulfat (II und III)	190	5,2	0,99
Kaliumjodid (III)	765 000 000	0,0348	26 650

[1]) Vgl. *Th. von Fellenberg, H. Geilinger* und *K. Schweizer*, Untersuchungen über das Vorkommen von Jod in der Natur. VIII. Über das Freiwerden elementaren Jods aus Erde, diese Zeitschr. **152**, 177, 1924.

[2]) Alter Stallmist vom Liebefeld, Anfang Juli entnommen.

[3]) Es wurde hier nicht das verwendete Düngemittel untersucht, sondern eine andere Probe.

Somit stehen den einzelnen Pflanzen in den verschiedenen Parzellen aus der Düngung zur Verfügung:

In Parzelle I . . . . 60,2 γ J
„ „ II . . . . 61,2 γ J
„ „ III . . . . 27000 γ J

wovon bei den Parzellen I und II nur 1 und 2 γ als anorganisches Jodid vorliegen.

Die jodarmen Düngemittel machen zusammen 0,25 Proz. der Jodmenge aus, welche der Pflanze in Parzelle III durch die Joddüngung gegeben wird.

Ferner kommt jeder Pflanze noch eine gewisse Menge Jod aus der Erde zu. Jede Pflanze hat einen Raum von 0,186 qm zur Verfügung, wenn wir annehmen, daß der zwischen den Pflanzen liegende Raum voll ausgenutzt werde. Wenn wir wiederum die für die Pflanze benutzbare Tiefe auf 20 cm und das spezifische Gewicht der Erde auf 1,5 veranschlagen, so berechnet sich die Menge Erde, aus welcher die Pflanze ihre Nährstoffe entnehmen kann, auf 55,8 kg.

Darin sind, wenn wir von dem fest gebundenen, nur durch Aufschließen bestimmbaren und dem in HCl löslichen Jod absehen, etwa 600 γ anorganisch und 49000 γ organisch gebundenes Jod enthalten.

Berücksichtigen wir nun noch das durch die Niederschläge zur Erde gebrachte Jod. Dasselbe wurde[1]) für Bern zu 557 γ pro Quadratmeter und pro Jahr berechnet. Daraus würde sich für den der Rübe zur Verfügung stehenden Raum für die Zeitdauer von der Kopfdüngung (8. Juli) bis zur Ernte (7. Oktober) 25 γ Jod ergeben, wovon wir 15 γ als anorganisch und 10 γ als organisch gebundenes Jod annehmen können. Wir berücksichtigen nur diese letzten 3 Monate, weil die Pflanze in ihrem Anfangsstadium wesentlich weniger Raum beansprucht.

Es stehen also schließlich den einzelnen Pflanzen folgende Jodmengen zur Verfügung:

Tabelle IV.

Jodmenge im Bereich der einzelnen Pflanzen.

	Parzelle I		Parzelle II		Parzelle III	
	anorgan. γ	organisch γ	anorgan. γ	organisch γ	anorgan. γ	organisch γ
Aus dem Boden . . .	600	49 000	600	49 000	600	49 000
Aus den Düngstoffen .	1	59	2	60	27 000	60
Durch d. Niederschläge	15	10	15	10	15	10
Summe	616	49 069	617	49 070	27 615	49 070

Bei Parzelle III nimmt natürlich das anorganische Jod schnell ab.

[1]) Siehe *Th. von Fellenberg,* diese Zeitschr. **139**, **434**, 1923.

Vergleichen wir nun mit diesen Zahlen die wirklich aufgenommenen Jodmengen. Sie sind in der Tabelle V angegeben.

Tabelle V.

Jodgehalte der Runkelrübenwurzeln und -blätter.

	Wurzeln			Blätter		
	I	II	III	I	II	III
γ J pro kg frischer Substanz	11	11	25	11	11	89
Proz. Trockensubstanz	8,68	8,88	8,53	8,24	9,86	8,05
γ J pro kg Trockensubstanz	127	124	290	133	112	1120
Mittleres Gewicht der Pflanzen in g	840	880	855	192	239	230
Jodgehalt pro Pflanze, g	9,3	9,7	21,4	2,1	2,6	20,5

	I	II	III
Jodgehalt der ganzen Pflanze	11,4	12,3	41,9
Aufgenommenes Jod in Proz. d. vorhandenen anorganischen Jods	1,9	2,0	0,09

Wir sehen, daß die Pflanzen nur einen außerordentlich geringen Teil des vorhandenen Jods aufgenommen haben. Auch wenn wir den zur Verfügung stehenden Raum mehrfach überschätzt haben sollten, ändert dies am Endresultat nur wenig. Bei den Parzellen I und II hätte bereits das durch die Niederschläge herabgebrachte Jod genügt, um die aufgenommene Menge zu liefern.

Das organische Jod fällt selbstverständlich als direkte Jodquelle außer Betracht. Indirekt kann es hingegen wirken. Bei der allmählichen Mineralisierung der organischen Substanzen sollte es aller Voraussicht nach wieder in anorganische Form übergeführt werden. In welchem Grade und in welchem Zeitraum dies bei den einzelnen Böden geschieht, entzieht sich unserer genaueren Kenntnis. Frühere Untersuchungen[1]) haben gezeigt, daß die Böden stets jodreicher, meist sogar bedeutend jodreicher sind, als die Gesteine, aus denen sie hervorgegangen sind. Demnach dürfte die Mineralisierung des organischen Jods im allgemeinen in geringerem Maße erfolgen, als die Überführung des anorganischen Jods in organisches.

Wenn wir die von uns gefundene Jodaufnahme durch die Runkeln mit der von *Stoklasa* festgestellten vergleichen, so finden wir bei den Wurzeln eine bedeutend geringere, bei den Blättern eine stärkere Speicherung. Dieser Unterschied könnte wohl in der Verschiedenartigkeit der Erden begründet sein. Unsere energisch oxydierende Diluvialerde zersetzt, wie erwähnt, das zugesetzte Jodid nahezu ganz.

[1]) Diese Zeitschr. **157**, 163, 1924.

Tabelle VI.

Fütterungsplan und Versuchsergebnisse. Versuchstiere: Netti und Adler.

Periode	Datum von abends bis morgens	Futterration je Stück und Tag in kg: Gras	Runkelrübenblätter von Parzelle II (ohne Jod) Adler	Runkelrübenblätter von Parzelle III (mit Jod) Netti	Weizenkleie	Durchschnittl. täglicher Milchertrag in kg: Adler	Netti	Datum der Milchprobeentnahme	Milchqualität*) von Adler: Fett Proz.	Spez. Gew.	Trockensubstanz Proz.	Fettfreie Trockensubstanz Proz.	Milchqualität*) von Netti: Fett Proz.	Spez. Gew.	Trockensubstanz Proz.	Fettfreie Trockensubstanz Proz.
Vorperiode	30. IX. bis 7. X.	bis zur Sättigung	—	—	0,500	10,1	10,7	1./2. X.	4,20	34,8	13,98	9,78	4,29	31,5	13,26	8,97
Versuchsperiode	7. X. bis 13. X.		30	30	0,500	9,4	10,6	6./7. X.	4,83	34,0	14,55	9,72	4,23	31,4	13,17	8,94
								15./16. X.	4,71	34,2	14,45	9,74	4,40	31,2	13,33	8,93
Nachperiode	13. X. bis 28. X.		—	—	0,500	9,2	9,9	29./30. X.	5,09	36,0	—	—	4,49	32,0	13,63	9,14

*) Analysen der schweizerischen milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt Liebefeld-Bern.

Obschon der größte Teil als organisches, für die Pflanzen nicht direkt assimilierbares Jod in der Erde bleibt, so kann doch ein kleiner Teil in elementarem Zustande in die Luft entweichen und durch die Blätter aufgenommen werden. Das würde den höheren Jodgehalt der Blätter erklären.

Die von *Stoklasa* verwendete geologisch sehr alte Erde aus der Umgebung von Prag dürfte sich wesentlich anders verhalten. Sie wirkte vermutlich bedeutend weniger oxydierend. Daher blieb das Jodid längere Zeit unverändert in der Erde, so daß die Wurzeln mehr davon aufnehmen konnten. Andererseits mußte hier das Entweichen elementaren Jods und somit die direkte Aufnahme der Blätter aus der Luft geringer sein.

2. Fütterungsversuche.

Die Versuche wurden mit den Runkelrübenblättern und -wurzeln an je zwei Kühen durchgeführt. Besprechen wir zuerst den mit den Blättern angestellten Versuch.

a) Versuch mit den Runkelrübenblättern.
(Siehe Tabelle VI.)

Irgendwelche positive Schlüsse auf die Beeinflussung des Milchertrages und der Milchqualität durch die Fütterung mit den jodreichen Blättern können aus diesen Ergebnissen nicht gezogen werden. Der raschere Milchrückgang bei Adler rührt davon her, daß die Trächtigkeit bereits

weiter fortgeschritten war, als bei Netti. Aus den Fettgehaltszahlen ergibt sich keine Regelmäßigkeit. Die Zunahme des Fettgehalts bei Netti ist eine konstante, hält also auch an, nachdem keine Rübenblätter mehr verfüttert wurden. Die Milchgehaltsverbesserung ist bei beiden Kühen eine Folge der fortschreitenden Lactation (altmelk).

Für die Stoffwechselversuche wurde der Jodgehalt von Harn, Kot und Milch festgestellt. Man suchte, soweit dies möglich war, eine Jodbilanz aufzustellen. Dazu mußte außer den Rübenblättern auch das übrige Futter auf Jod untersucht werden.

Eine sehr große Genauigkeit konnte von der Bilanz nicht erwartet werden, da man nicht die ganze tägliche Harn- und Kotausscheidung auffing, sondern nur einzelne Proben, die in der Zusammensetzung vielleicht nicht dem genauen Durchschnitt entsprachen und indem man die Gesamtmenge der Ausscheidungen nur schätzte. Die Milchproben sind eine Mischung gleicher Teile der Morgen- und Abendmilch.

Die Jodbestimmungen wurden im allgemeinen nach früher publizierten Verfahren[1]) ausgeführt.

Der Graskonsum der Tiere konnte nur geschätzt werden. Man veranschlagte ihn auf 50 kg täglich. Die abgesonderte Harnmenge wurde auf 20 Liter, der Kot auf 30 kg geschätzt. Durch Lungen und Haut würden dann etwa 20 kg Wasser abgegeben. Die mittlere Milchmenge betrug bei Adler 9,4, bei Netti 10,5 Liter.

Die gefundenen Jodmengen sind in der Tabelle VII wiedergegeben.

Tabelle VII.
Fütterungsversuch mit Runkelrübenblättern; ausgeschiedene Jodmengen als γ J in Kilogrammen.

Datum	Adler Rübenkraut ohne Joddüngung			Netti Rübenkraut mit Joddüngung		
	Harn	Kot	Milch	Harn	Kot	Milch
6./7. X.	—	—	20	—	—	22
8./9. X.	8	36	15	23	62	20
10./11. X.	10	40	12	20	40	41
12./13. X.	14	54	18	23	164	17

Versuchen wir, eine Jodbilanz aufzustellen. Die Tabelle VIII gibt die tägliche Jodaufnahme, Tabelle IX die tägliche Ausscheidung, soweit sie sich kontrollieren läßt, wieder.

Die Bilanz stimmt nicht gut. Wir finden in den Ausscheidungen nur 63 bzw. 67 Proz. des aufgenommenen Jods. Sie kann aber auch nicht stimmen, denn wir haben die Ausscheidung durch die Haut nicht berücksichtigt. Zudem ist eine gewisse Speicherung von Jod, wenigstens

[1]) *Th. von Fellenberg*, diese Zeitschr. 152, 116, 1924.

Tabelle VI.

Fütterungsplan und Versuchsergebnisse. Versuchstiere: Netti und Adler.

Periode	Datum von abends bis morgens	Futterration je Stück und Tag in kg: Gras	Runkelrübenblätter von Parzelle II (ohne Jod) Adler	Runkelrübenblätter von Parzelle III (mit Jod) Netti	Weizenkleie	Durchschnittl. täglicher Milchertrag in kg: Adler	Netti	Datum der Milchprobentnahme	Milchqualität*) von Adler: Fett Proz.	Spez. Gew.	Trockensubstanz Proz.	Fettfreie Trockensubstanz Proz.	Milchqualität*) von Netti: Fett Proz.	Spez. Gew.	Trockensubstanz Proz.	Fettfreie Trockensubstanz Proz.
Vorperiode	30. IX. bis 7. X.	bis	—	—	0,500	10,1	10,7	1./2. X.	4,20	34,8	13,98	9,78	4,29	31,5	13,26	8,97
Versuchsperiode	7. X. bis 13. X.	zur Sätti-	30	30	0,500	9,4	10,6	6./7. X.	4,83	34,0	14,55	9,72	4,23	31,4	13,17	8,94
								15./16. X.	4,71	34,2	14,45	9,74	4,40	31,2	13,33	8,93
Nachperiode	13. X. bis 28. X.	gung	—	—	0,500	9,2	9,9	29./30. X.	5,09	36,0	—	—	4,49	32,0	13,63	9,14

*) Analysen der schweizerischen milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt Liebefeld-Bern.

Obschon der größte Teil als organisches, für die Pflanzen nicht direkt assimilierbares Jod in der Erde bleibt, so kann doch ein kleiner Teil in elementarem Zustande in die Luft entweichen und durch die Blätter aufgenommen werden. Das würde den höheren Jodgehalt der Blätter erklären.

Die von *Stoklasa* verwendete geologisch sehr alte Erde aus der Umgebung von Prag dürfte sich wesentlich anders verhalten. Sie wirkte vermutlich bedeutend weniger oxydierend. Daher blieb das Jodid längere Zeit unverändert in der Erde, so daß die Wurzeln mehr davon aufnehmen konnten. Andererseits mußte hier das Entweichen elementaren Jods und somit die direkte Aufnahme der Blätter aus der Luft geringer sein.

2. Fütterungsversuche.

Die Versuche wurden mit den Runkelrübenblättern und -wurzeln an je zwei Kühen durchgeführt. Besprechen wir zuerst den mit den Blättern angestellten Versuch.

a) Versuch mit den Runkelrübenblättern. (Siehe Tabelle VI.)

Irgendwelche positive Schlüsse auf die Beeinflussung des Milchertrages und der Milchqualität durch die Fütterung mit den jodreichen Blättern können aus diesen Ergebnissen nicht gezogen werden. Der raschere Milchrückgang bei Adler rührt davon her, daß die Trächtigkeit bereits

weiter fortgeschritten war, als bei Netti. Aus den Fettgehaltszahlen ergibt sich keine Regelmäßigkeit. Die Zunahme des Fettgehalts bei Netti ist eine konstante, hält also auch an, nachdem keine Rübenblätter mehr verfüttert wurden. Die Milchgehaltsverbesserung ist bei beiden Kühen eine Folge der fortschreitenden Lactation (altmelk).

Für die Stoffwechselversuche wurde der Jodgehalt von Harn, Kot und Milch festgestellt. Man suchte, soweit dies möglich war, eine Jodbilanz aufzustellen. Dazu mußte außer den Rübenblättern auch das übrige Futter auf Jod untersucht werden.

Eine sehr große Genauigkeit konnte von der Bilanz nicht erwartet werden, da man nicht die ganze tägliche Harn- und Kotausscheidung auffing, sondern nur einzelne Proben, die in der Zusammensetzung vielleicht nicht dem genauen Durchschnitt entsprachen und indem man die Gesamtmenge der Ausscheidungen nur schätzte. Die Milchproben sind eine Mischung gleicher Teile der Morgen- und Abendmilch.

Die Jodbestimmungen wurden im allgemeinen nach früher publizierten Verfahren[1]) ausgeführt.

Der Graskonsum der Tiere konnte nur geschätzt werden. Man veranschlagte ihn auf 50 kg täglich. Die abgesonderte Harnmenge wurde auf 20 Liter, der Kot auf 30 kg geschätzt. Durch Lungen und Haut würden dann etwa 20 kg Wasser abgegeben. Die mittlere Milchmenge betrug bei Adler 9,4, bei Netti 10,5 Liter.

Die gefundenen Jodmengen sind in der Tabelle VII wiedergegeben.

Tabelle VII.
Fütterungsversuch mit Runkelrübenblättern; ausgeschiedene Jodmengen als γ J in Kilogrammen.

Datum	Adler Rübenkraut ohne Joddüngung			Netti Rübenkraut mit Joddüngung		
	Harn	Kot	Milch	Harn	Kot	Milch
6./7. X.	—	—	20	—	—	22
8./9. X.	8	36	15	23	62	20
10./11. X.	10	40	12	20	40	41
12./13. X.	14	54	18	23	164	17

Versuchen wir, eine Jodbilanz aufzustellen. Die Tabelle VIII gibt die tägliche Jodaufnahme, Tabelle IX die tägliche Ausscheidung, soweit sie sich kontrollieren läßt, wieder.

Die Bilanz stimmt nicht gut. Wir finden in den Ausscheidungen nur 63 bzw. 67 Proz. des aufgenommenen Jods. Sie kann aber auch nicht stimmen, denn wir haben die Ausscheidung durch die Haut nicht berücksichtigt. Zudem ist eine gewisse Speicherung von Jod, wenigstens

[1]) *Th. von Fellenberg*, diese Zeitschr. **152**, 116, 1924.

Tabelle VIII. Tägliche Jodaufnahme der Versuchstiere.

	Jogehalt der Futtermittel γ J pro kg	γ aufgenommenes Jod pro Tag	
		Adler	Netti
30 kg Rübenbl. ohne Joddüngung	11	330	—
Ebenso, jodgedüngt	89	—	2670
0,5 kg Kleie	66	33	33
50 kg Gras	46	2300	2300
Summe des täglich aufgenommenen Jods		2663	5003

Tabelle IX. Tägliche Jodausscheidung der Versuchstiere.

	Jodgehalt der Ausscheidungen γ J pro Tag		γ ausgeschiedenes Jod pro Tag	
	Adler	Netti	Adler	Netti
20 kg Harn	10,7	22	214	440
30 kg Kot	43,3	28,7	1300	2660
9,4 und 10,5 kg Milch	16,3	25	153	273
Summe des kontrollierten ausgeschiedenen Jods			1667	3373
Differenz			996	1630

bei der jodreicheren Nahrung, anzunehmen. Ich habe früher gezeigt[1]), daß die Jodausscheidung durch die Haut beim Menschen eine sehr wechselnde ist. Im Durchschnitt von 31 Tagen betrug sie 5,5 Proz., im Maximum, als ein Schwitzbad verabreicht wurde, 30 Proz. der gesamten Ausscheidung. Wieviel sie bei der Kuh ausmacht und ob dadurch das Defizit einigermaßen gedeckt würde, läßt sich nicht feststellen. Wir können aber aus unseren Versuchen immerhin folgendes ersehen:

Die Jodverbindungen des Grases und des Rübenkrauts sind nur teilweise resorbierbar. Ein sehr großer Teil geht mit dem Kot unverdaut ab. Dies Ergebnis stimmt überein mit einem Versuch am Menschen bei Genuß von Gemüse[2]). Mit der Milch wird nur wenig Jod ausgeschieden, und zwar eine ähnliche Menge, wie mit dem Harn. Durch Verfütterung von jodgedüngten Rübenblättern ließ sich eine deutliche Erhöhung des Jodgehalts in der Milch feststellen. Sie ist aber nicht bedeutend und macht relativ weniger aus, als die Erhöhung im Harn und im Kot.

Gehen wir nun über zu dem Fütterungsversuch mit Runkelrüben.

b) Fütterungsversuch mit Runkelrüben. Siehe Tabelle X.

Die Milchrückgänge waren bei beiden Tieren normal, d. h. ein Einfluß der Joddüngung auf den Milchertrag scheint nicht vorhanden

[1]) *Th. von Fellenberg,* Über den Jodstoffwechsel. I., diese Zeitschr. **142**, 246, 1924.

[2]) l. c.

Tabelle X.

Fütterungsplan und Versuchsergebnisse. Versuchstiere: Netti und Lisi.

Periode	Datum von abends	Datum bis morgens	Futterration je Stück und Tag in kg: Heu und Emd	Heuhäcksel	Runkelrüben von der Betriebsfläche Lisi u. Netti	Runkelrüben von d. Versuchsparzellen II (ohne Jod) Lisi	Runkelrüben von d. Versuchsparzellen III (mit Jod) Netti	Erdnußmehl	Weizenkleie	Durchschnittl. täglicher Milchertrag in kg: Lisi	Netti
Vorperiode	12. XI.	bis 17. XI.	bis zur Sättigung	1,5	10	—	—	0,5	1,0	5,7	7,4
Versuchsperiode	17. XI.	„ 4. XII.		1,5	—	10	10	0,5	1,0	5,7	7,2
Nachperiode	4. XII.	„ 9. XII.		1,5	10	—	—	0,5	1,0	5,4	6,5

Ergebnisse der Milchuntersuchungen.

Datum der Milchprobenahme	Milchqualität bei Lisi *): Fett Proz.	Spez. Gew.	Trockensubstanz Proz.	Fettfreie Trockensubstanz Proz.	Milchqualität bei Netti *): Fett Proz.	Spez. Gew.	Trockensubstanz Proz.	Fettfreie Trockensubstanz Proz.
14./15. XI.	3,91	33,5	13,31	9,40	5,42	30,6	14,41	8,99
19./20. XI.	3,62	31,3	12,42	8,80	4,31	30,2	12,97	8,66
26./27. XI.	3,25	34,3	12,79	9,49	4,01	32,8	13,26	9,25
3./4. XII.	3,81	33,7	13,26	9,44	4,57	32,5	13,89	9,29
8./9. XII.	3,99	32,1	13,07	9,07	3,90	31,3	12,77	8,89

*) Analysen der schweizerischen milchwirtschaftlichen und bakteriologischen Anstalt Liebefeld-Bern.

gewesen zu sein. Auch aus den Erhebungen über die Milchqualität geht nichts Positives hervor.

Die Tabelle XI gibt die gefundenen Jodmengen wieder.

Tabelle XI.
Fütterungsversuch mit Runkelrüben. Ausgeschiedene Jodmengen als γ J in Kilogrammen.

	Datum	Lisi. Ohne Joddüngung			Netti. Mit Joddüngung		
		Harn	Kot	Milch	Harn	Kot	Milch
Normale Fütterung	14./15. XI.	44	60	58	38	60	52
Versuchsfütterung .	19./20. XI.	15	42	50	22	50	50
„ .	26./27. XI.	25	50	76	22	42	76
„ .	3./4. XII.	28	38	58	15	34	60
Normale Fütterung	8./9. XII.	40	25	75	25	22	100

Die tägliche Jodaufnahme gibt die Tabelle XII.

Tabelle XII.
Tägliche Jodaufnahme der Versuchstiere.

	Jodgehalt als γ J pro kg	Gesamter Jodgehalt	
		Lisi γ	Netti γ
10 kg Runkelrüben, ungedüngt .	11	110	—
10 „ „ jodgedüngt .	25	—	250
1 kg Kleie	66	66	66
500 g Erdnußkuchen	95	48	48
10 kg Heu	400	4000	4000
	Summe	**4224**	**4364**

Die Menge des aufgenommenen Jods ist hier bedeutend höher als bei dem Rübenblätterversuch; dementsprechend gehen auch größere Jodmengen in die Milch. Die Mehraufnahme rührt aber nicht von den Rüben, sondern vom Heu her. Der Jodgehalt der Runkelrüben, auch der jodgedüngten, verschwindet neben dem Jodgehalt des Heues nahezu ganz. Wir sehen deshalb von der Aufstellung einer Bilanz ab und begnügen uns mit der Feststellung, daß ein deutlicher Unterschied im Jodgehalt der Ausscheidungen der beiden Kühe nicht aufgetreten ist.

Im Zusammenhang mit diesen Versuchen sei noch kurz ein Fütterungsversuch mit jodhaltigem Kochsalz erwähnt, den *O. Stiner*[1]) am Viehbestand der Arbeitsheilstätte Tenero bei Locarno im Laufe des Jahres 1924 vorgenommen hat. Die Tiere erhielten täglich mit 100 g jodiertem Kochsalz (1 : 200000) die Menge von 500 γ Kaliumjodid oder 380 γ Jod.

[1]) *O. Stiner*, Jodiertes Kochsalz und Milchsekretion, Protokoll der Sitzung der schweizerischen Kropfkommission vom 18. Februar 1925.

Während der Versuchszeit wurden siebenmal Milchproben der jodgefütterten und der Kontrollkühe auf Jod untersucht, und zwar Mischproben von je etwa zehn Kühen. Die Unterschiede im Jodgehalt waren jedesmal sehr gering oder überhaupt Null. Sie lagen stets innerhalb der Fehlergrenze. Durchschnittlich fand ich bei den jodgefütterten Tieren 59, bei den Kontrolltieren 57 γ Jod im Liter Milch.

Auch dies Resultat rührt daher, daß die Mehraufnahme an Jod durch die spezielle Jodfütterung im Vergleich zu dem durch das gewöhnliche Futter aufgenommenen Jod viel zu gering ist. Sie mag kaum mehr als 10 Proz. ausmachen. Ein Teil davon wird wahrscheinlich gespeichert; der ausgeschiedene Rest verteilt sich auf Kot, Harn und Milch und der in die Milch gelangende Teil ist so gering, daß er nicht mehr mit Sicherheit analytisch erfaßt werden kann.

Eine wirklich bedeutende Jodanreicherung in der Milch konnte ich bei einer Ziege beobachten. Herrn Prof. *Noyer* verdanke ich eine Anzahl Ziegenmilchproben, die von einem thyreoektomierten Tiere in den ersten Tagen nach der Thyreoektomie stammen. Bei der Operation wurde ein kräftiger Jodanstrich angebracht. Vor der Operation bzw. vor dem Jodanstrich betrug der Jodgehalt der Milch 60 γ im Liter. Die Operation wurde am 9. Januar 1924 10 Uhr vormittags vorgenommen. Die Milchen ergaben folgende Jodgehalte:

Tabelle XIII.
Jodgehalt von Ziegenmilch nach Anwendung von Jodtinktur.

Datum	γ J im Liter	Datum	γ J im Liter
10. I. morgens	7540	13. I. morgens . . .	1160
10. I. abends	5150	13. I. abends	730
11. I. morgens	4280	14. I. morgens . . .	1510
11. I. abends	6580	14. I. abends	1150
12. I. morgens	3960	15. I. morgens . . .	730
12. I. abends	1960		

Die Menge des angewendeten Jods ließ sich nicht feststellen. Der Jodgehalt der Milch ist anfangs auf mehr als das 100fache gestiegen. Nach 5 Tagen beträgt er noch ungefähr $^1/_{10}$ der anfänglichen Menge. Es wurde festgestellt, daß das Jod nicht an Fett gebunden war.

Es ist nicht wahrscheinlich, daß dies Ergebnis mit der Entfernung der Schilddrüse im Zusammenhang steht. Vor allem dürfte die große Jodmenge, vielleicht auch die spezielle Form und die Anwendungsart des Jods maßgebend gewesen sein.

Das überraschendste Resultat unserer Versuche besteht darin, daß sich im Kot der Kühe so reichliche Jodmengen fanden. Bei Versuchen am Menschen (l. c.) hatte ich zwar gefunden, daß nach Genuß reichlicher Mengen Brunnenkresse ein großer Teil des darin vorhandenen

Jods in den Kot ging. Ich war aber damals geneigt, das eher auf eine unter den gegebenen Verhältnissen momentane schlechte Verdauung des in zu großer Menge genossenen, mir etwas ungewohnten Gemüses zurückzuführen. Nun zeigen unsere vorliegende Versuche, daß in den grünen Pflanzenteilen, welche ja zu den jodreichsten Nahrungsmitteln gehören, neben resorbierbaren Jodverbindungen auch solche vorhanden sind, welche nicht einmal durch das Rind verdaut werden. Wenn aber das Rind, welches sogar Cellulose verdaut, diese Verbindungen nicht bewältigen kann, dürfen wir sie wohl überhaupt als unverdaulich bezeichnen.

Es zeigt uns dies, daß wir uns im Hinblick auf die Kropfprophylaxe nicht damit begnügen dürfen, den Gesamtjodgehalt der Nahrung kennenzulernen. Was uns interessieren muß, ist der resorbierbare Anteil des Jods, und selbst beim resorbierten Jod dürfte eine weitere Differenzierung notwendig werden.

Zusammenfassung.

1. Unser Düngungsversuch mit Kaliumjodid ergab eine nur geringe Anreicherung an anorganischem Jod in der Erde. Nahezu alles wurde nach vorausgehender Oxydation zu elementarem Jod an die organischen Stoffe der Erde (Düngstoffe usw.) gebunden.

2. Da nur anorganisches Jod assimiliert werden kann, betrug die Mehraufnahme der Pflanzen an Jod in den jodgedüngten Parzellen nur einen winzigen Bruchteil des angewendeten Jodides.

3. Die Runkelrübenblätter nahmen bedeutend mehr Jod auf, als die Wurzeln, was für ein teilweises Entweichen elementaren Jods in die Luft und eine direkte Aufnahme durch die Blätter spricht.

4. Ein Mehrertrag der Ernte durch die Joddüngung ließ sich im Gegensatz zu *Stoklasa*, der die Versuche allerdings mit Zuckerrüben angestellt hatte, nicht feststellen. Das verschiedene Resultat dürfte in der Verschiedenheit der Böden begründet sein.

5. Die Fütterung mit den jodreicheren Runkelrübenblättern ergab eine zwar nicht sehr große, aber doch deutliche Jodzunahme in der Milch. Bei den Wurzeln ließ sich eine solche nicht erkennen.

6. Die Hauptmengen des ausgeschiedenen Jods wurden im Harn und besonders im Kot gefunden. Ein starkes Defizit in der Bilanz deutet auf eine bedeutende Jodausscheidung durch die Haut hin.

7. Der Jodreichtum des Kuhkotes zeigt, daß im Gras unresorbierbare Jodverbindungen in verhältnismäßig großer Menge enthalten sind.

Über die relative Viskosität der Eiweißkörper des menschlichen Blutserums und die Methodik ihrer Bestimmung.

Von

W. Starlinger und K. Hartl.

(Aus der II. medizinischen Universitätsklinik in Wien.)

(Eingegangen am 12. Mai 1925.)

Um Einblick in die biologisch und klinisch immer mehr gewerteten Änderungen der physikalisch-chemischen Struktur der Bluteiweißkörper zu gewinnen, stehen heute vor allem drei Möglichkeiten zu Gebote: Die unmittelbare maßanalytische Bestimmung des Fibrinogens und der mit Hilfe klassischer Neutralsalzfällung abgeschiedenen Serumeiweißkörpergruppen[1]), die Bestimmung der Kolloidstabilität des Fibrinogens und der Serumeiweißkörpergruppen mit Hilfe verschiedenster Methodik[2]) und schließlich die Bestimmung der Abweichung, welche die innere Reibung des Serums von der Normallage bei Änderung des physikalisch-chemischen Zustandes erfährt.

Die folgende Darstellung will sich lediglich mit der Durchführung und Ausgestaltung der letzten Möglichkeit beschäftigen und wird versuchen, die Grundlagen diesbezüglicher Methodik kritisch zu prüfen, eine Aufgabe, die sich in Anbetracht vielfacher sprachlicher und sachlicher Gegensätzlichkeit der zur vorliegenden Frage Stellung nehmenden Arbeiten als notwendig erwies.

Vorausgeschickt sei die grundsätzliche Feststellung, daß diese methodische Möglichkeit im Gegensatz zur direkten Maßanalyse und Kolloidlabilitätsmessung, welche *alle* Eiweißkörper des Blut*plasmas* in den Bereich der Untersuchung ziehen, von vornherein nur das Verhalten des *Serums* und seiner Komponenten zu erfassen imstande ist, weil die Bestimmung der inneren Reibung nativen (d. i. des durch keinen gerinnungsverhindernden Zusatz veränderten) Blutplasmas technisch nicht durchgeführt werden kann, die Viskositätsbestimmung künstlich

[1]) Siehe die zusammenfassende Kritik der Maßanalyse: des Fibrinogens: *W. Starlinger*, I. Mitteilung diese Zeitschr. **140**, 1923; *Derselbe*, II. Mitteilung ebendaselbst **143**, 1924; *W. Starlinger* und *K. Hartl*, III. Mitteilung, ebendaselbst **157**, 1925; der Serumeiweißkörpergruppen: *Dieselben* I. bis III. Mitteilung, ebendaselbst 1925, im Erscheinen.

[2]) Siehe *W. Starlinger*, Klin. Wochenschr. 29, 1923.

beeinflußten (Salz-)Plasmas aber keine verwertbaren Angaben über die *native* Struktur zu vermitteln vermag.

In der Literatur liegen zur vorliegenden Fragestellung folgende Angaben vor, welche zuerst in der Folge ihres Erscheinens kurz angeführt, später ihrer inneren Zusammengehörigkeit nach kritisch betrachtet werden sollen:

Rusznyak[1]) bringt die zu untersuchenden Seren mittels Ultrafiltration (nach *Bechhold*) auf gleichen titrimetrisch nach *Deyke* und *Ibrahim*[2]) ermittelten Eiweißgehalt von 10 g-Proz. und vergleicht die solcherweise erhaltenen Viskositätswerte (= reduzierte Viskosität) unmittelbar miteinander.

Die jeweils gefundene Viskosität des zu untersuchenden Blutserums (η) wird in Beziehung gesetzt:

von *Bircher*[3]) zur gefundenen Gesamtrefraktion des Vollserums, ausgedrückt in *Pulfrich*schen Skalenteilen (R) nach der Formel: $\frac{R \times 10}{\eta}$ (= refrakto-viskosimetrischer Index);

von *Hellwig* und *Neuschloss*[4]) zur Viskosität eines Normalserums von (maßanalytisch ermitteltem) gleichem Eiweißgehalt (η_m), abzulesen aus (maßanalytisch) selbst geeichten Tabellen, nach der Formel: $\frac{\eta}{\eta_m}$ (= Viskositätsfaktor, später auch: spezifische Viskosität);

von *P. Spiro*[5]) zur Viskosität eines Normalserums von (refraktometrisch ermitteltem) gleichem Eiweißgehalt (η), abzulesen aus *Naegelis*[6]) (refraktometrisch geeichten) Tabellen, nach der Formel: $\frac{\eta}{\eta_r}$ (= spezifische Viskosität);

von *Petschacher*[7]) zum Eiweißgehalt in Grammprozenten, refraktometrisch ermittelt nach *Robertson*[8]) (g-Proz. E_r) nach der Formel: $\frac{\eta}{\text{g-Proz. } E_r}$ (= spezifische Viskosität des Gesamtproteins); später[9]) unter Abzug der mittleren Viskosität enteiweißten Normalserums (1,02) nach der Formel: $\frac{\eta - 1{,}02}{\text{g-Proz. } E_r}$ (= spezifische Viskositätserhöhung der Serumeiweißkörper);

von *Hafner*[10]) zum (anscheinend refraktometrisch ermittelten) Eiweißgehalt in Grammprozenten nach der Formel: $\frac{\eta}{\text{g-Proz. } E_r}$ (= Viskositäts-

---

[1]) *Rusznyak*, diese Zeitschr. **138**, 1922.

[2]) *Deyke* und *Ibrahim*, Zeitschr. f. klin. Med. 58, 1906.

[3]) *Bircher*, Ref. Ber. f. d. ges. Physiol. **15**, 509, 1922.

[4]) *Hellwig-Neuschloss*, Klin. Wochenschr. **40**, 1922.

[5]) *P. Spiro*, ebendaselbst 37—38, 1923; Arch. f. exper. Pathol. u. Phys. 100, 1923.

[6]) *Naegeli*, Blutkrankheiten **3**. Berlin, Springer, 1919.

[7]) *Petschacher*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 1923.

[8]) *Robertson*, Journ. of biol. Chem. 1915.

[9]) *Petschacher*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 41, 1924.

[10]) *Hafner*, Arch. f. exper. Pathol. 101, 1924.

eiweißquotient; neuerdings: Viskositäts-Konzentrationsquotient); später[1]) unter Abzug der Viskosität des enteiweißten Serums (η_e) zur Viskosität von Normalserum (refraktometrisch ermittelten) gleichen Eiweißgehalts, abzulesen aus *Naegelis* Tabellen, unter Abzug des *Petschacher*schen Wertes für die mittlere Viskosität enteiweißten Normalserums nach der Formel: $\frac{\eta - \eta_e}{\eta_r - 1{,}02}$ [= Zustandsviskosität[2])].

Der inneren Zusammengehörigkeit nach lassen sich also folgende Gruppen unterscheiden:

I. Das Verfahren von *Rusznyak*;

II. Das Verfahren von *Bircher*;

III. Die Verfahren von *Petschacher* (erstes und zweites Verfahren) und *Hafner* (erstes Verfahren);

IV. Die Verfahren von *Hellwig-Neuschloss*, *P. Spiro* und *Hafner* (zweites Verfahren).

Die erste Gruppe vergleicht die Viskosität auf der Basis *tatsächlich bestehenden*, die dritte Gruppe auf der Basis *rechnerisch supponierten* gleichen Eiweißgehalts, die zweite Gruppe auf der Basis des reziproken Refraktionswertes, die vierte Gruppe auf der Basis der Viskosität eiweißgleichkonzentrierten Normalserums.

Bevor nun an die spezielle Kritik der einzelnen, in jene Gruppen zusammengefaßten Verfahren gegangen werden soll, seien die Grundlagen der Allgemeinkritik in grundsätzlicher und technisch-methodischer Hinsicht kurz zusammengefaßt:

1. Das der Viskositätsmessung zugeführte Untersuchungsmaterial darf in seinem nativen Zustande keine Störung erlitten haben.

2. Die Vergleichsbasis muß adäquat sein, worunter zu verstehen ist, daß die in Verhältnis gesetzten Werte auf gleiche Serumbestandteile Bezug nehmen.

3. Die Vergleichsbasis muß konstant sein, worunter die Unabhängigkeit des Verhältniswertes von der Konzentration des jeweils zur Beurteilung gelangenden Serumanteils zu verstehen ist.

4. Die Formulierung des der Beurteilung zugrunde liegenden Ausdrucks hat so zu erfolgen, daß die Veränderungen des eiweißartigen Serumbestandteiles optimal dargestellt werden.

5. Die quantitative Eiweißbestimmung muß auf zuverlässiger maßanalytischer Grundlage beruhen:

Die Eiweißbestimmung auf refraktometrischem Wege ist unzulässig, da die ihr zugrunde liegende Annahme einer einheitlich-konstanten spezifischen Refraktion nicht zu Recht besteht (wobei betont sei, daß die Abweichung der refraktometrisch ermittelten von den maßanalytisch ermittelten Werten verständlicherweise keine gleichmäßige Größe darstellt, mithin auch die übliche Auffassung als „relativ" richtige Werte nicht aufrecht erhalten werden kann).

---

[1]) *Hafner*, Klin. Wochenschr. 5, 1925.

[2]) Auf den zweiten Ausdruck: $(\eta - \eta_e) - (\eta_r - 1{,}02)$ braucht hier nicht eingegangen zu werden.

Aus gleichem Grunde müssen die Tabellen von *Naegeli* grundsätzlich abgelehnt werden. Ihre großen Abweichungen gehen aus folgender Gegenüberstellung der Tabellen von *Hellwig-Neuschloss* hervor, welche auf exakter maßanalytischer Bestimmung der Eiweißkonzentration beruhen.

Eiweißkonzentration in g-Proz.	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5
Zugehöriger Viskositätswert nach: *Naegeli*	1,43	1,46	1,51	1,56	1,61	1,67	1,72	1,78	1,84	1,90
Zugehöriger Viskositätswert nach: *Hellwig-Neuschloss*	1,45	1,505	1,56	1,60	1,66	1,74	1,825	1,92	2,02	2,12

Das zu geringe Ausmaß der Werte *Naegelis* ist die notwendige Folge zu großer refraktometrisch errechneter Eiweißkonzentrationen.

Die spezielle Kritik der einzelnen Verfahren darf demnach feststellen:

I. Das Verfahren von Rusznyak vernachlässigt den ersten Grundsatz, da die ultrafiltrative Eindickung mit großer Wahrscheinlichkeit zu gerade viskosimetrisch am ehesten erfaßbaren Zustandsänderungen der Eiweißkörper führt.

Hinsichtlich der methodisch-technischen Durchführung sei auf die Notwendigkeit komplizierter Technik (Ultrafiltration) und großer Mengen Ausgangsmaterials (20 bis 30 ccm Serum) verwiesen. Über die Zuverlässigkeit des titrimetrischen Verfahrens zur quantitativen Eiweißbestimmung nach *Deyke* und *Ibrahim* stehen uns derzeit keine genügenden Erfahrungen zur Verfügung.

Die Vergleichsbasis ist adäquat, da Viskosität und Konzentration nur des Eiweißanteiles zueinander in Beziehung gesetzt werden; denn die auf den Nichteiweißanteil entfallende Viskosität darf in Anbetracht ihres verschwindenden Ausmaßes (= etwa 0,02) gegenüber der Viskositätsgröße 10 g-Proz. konzentrierten Eiweißes (= etwa 1,3 bis 5,0) vernachlässigt werden. Als nicht nötig erweist sich im Rahmen der Versuchsanordnung von *Rusznyak* der Abzug der Wasserviskosität, da der unmittelbar beobachtete Viskositätswert keiner weiteren rechnerischen Operation unterworfen wird.

II. Das Verfahren von Bircher verstößt gegen den dritten und vierten Grundsatz, denn:

die Vergleichsbasis ist nicht konstant, einerseits, weil sich die Vollrefraktion aus den quantitativ veränderlichen Teilrefraktionen der nichteiweißartigen und eiweißartigen Körper zusammensetzt, andererseits, weil die Teilrefraktion des eiweißartigen Bestandteils qualitativer Änderung in Abhängigkeit von der jeweiligen spezifischen Refraktion unterliegt;

die Formulierung des Ausdrucks erfolgt so, daß Veränderungen des Zustandes der Eiweißkörper nicht unmittelbar angezeigt werden können, da Vollviskosität und Vollrefraktion des Serums zueinander in Beziehung gesetzt werden, Änderungen der Konzentration der Nicht-

eiweißkörper aber die Viskosität kaum, die Refraktion stark, Änderungen der Konzentration der Eiweißkörper hingegen *beide* Größenwerte stark beeinflussen.

III. Das erste Verfahren von Petschacher und das erste Verfahren von Hafner verstoßen gegen den zweiten, dritten, vierten und fünften Grundsatz, denn:

die Vergleichsbasis ist nicht adäquat, vor allem, weil der Wasserviskositätswert nicht in Abzug gebracht wird, der Vollviskosität des Serums also nur die Konzentration einer Teilkomponente (des Eiweißbestandteils) gegenübergestellt wird; die Größe des dadurch bewirkten Fehlers wird durch folgendes Beispiel anschaulich gemacht:

Serum A hätte eine Gesamtviskosität von 1,80, Serum B von 1,60, die Eiweißkonzentration betrüge in beiden Seren 6,0 g-Proz.; die Viskositäts-Konzentrationsquotienten verhielten sich demnach ohne Abzug des Wasserwertes wie 0,30 : 0,27 = (100 : 90), bei Abzug des Wasserwertes wie 0,13 : 0,10 (= 100 : 77); die Bedeutung der im gleichen Sinne wirkenden Vernachlässigung der Viskosität der Nichteiweißkörper kommt diesem großen Fehler gegenüber erst in zweiter Linie in Betracht;

die Vergleichsbasis ist weiter nicht konstant, da bei Eiweißlösungen Veränderungen der Konzentration nicht von einfach proportionalen Veränderungen der Viskosität begleitet werden, ihr Abhängigkeitsverhältnis im Rahmen des Koordinatensystems also nicht durch eine Gerade ausgedrückt werden kann: Die Viskosität steigt stärker an als die Konzentration, das Verhältnis ist also, wenn die Konzentration als Abszisse, die Viskosität als Ordinate gilt, durch eine zur Ordinate konkaven Kurve darstellbar;

die Formulierung des Ausdrucks verschleiert das Ausmaß der auf Veränderungen der Eiweißkörper bezüglichen Viskositätsabweichung infolge der Einbeziehung der Wasserviskosität aus gleichem Grunde wie oben ausgeführt;

die Bestimmung der Eiweißkonzentration schließlich erfolgt refraktometrisch und vermittelt demnach unrichtige Werte.

Das zweite Verfahren von Petschacher verstößt nur gegen den dritten und fünften Grundsatz, und zwar in gleicher Weise wie das erste.

Die Vergleichsbasis ist hingegen durch Abzug der mittleren Viskosität enteiweißten Normalserums adäquat gestaltet, die Formulierung des Ausdrucks aus gleichem Grunde einwandsfrei.

IV. Die Verfahren von Hellwig-Neuschloss und P. Spiro verstoßen gegen den vierten Grundsatz, da der Wasserviskositätswert nicht in Abzug gebracht wird und daher das wirkliche Ausmaß der relativen, auf das Eiweiß entfallenden Viskositätsabweichung keine Darstellung findet,

das Verfahren von Spiro außerdem noch gegen den fünften Grundsatz, da die Eiweißbestimmung refraktometrisch erfolgt.

Die Vergleichsbasis hingegen ist in allen Verfahren adäquat und konstant.

Das zweite Verfahren von Hafner verstößt nur gegen den fünften Grundsatz, doch scheint der Hinweis berechtigt, daß die Einführung des Faktors η_e, also der Bestimmung der Viskosität des enteiweißten Serums einerseits keine praktische Berechtigung in Anbetracht der minimalen Ausschläge der Nichteiweißviskosität (welche in seltensten, extremsten Fällen kaum 0,02 erreichen) besitzt, andererseits aber eine bedeutende technische Erschwerung bedingt.

Zusammenfassend darf also festgestellt werden, daß allen vorliegenden Verfahren Mängel anhaften, die jedoch teilweise ausgeschaltet werden können, wenn einerseits die Vergleichsbasis durch Berücksichtigung des auf Nichteiweiß und Wasser entfallenden Viskositätsanteils adäquat gestaltet, andererseits auf die Verwendung der Refraktometrie zur quantitativen Eiweißbestimmung, sowie der *Naegeli*schen Tabellen grundsätzlich Verzicht geleistet wird; nicht ausschaltbar erweisen sich jene Mängel, die in der Inkonstanz der Versuchsbasis begründet liegen.

In Ausführung dieser Möglichkeit, ausschaltbare Fehler zu beseitigen, können also folgende Ausdrücke als typisch formuliert werden:

Zum Verständnis der verwendeten Symbole sei bemerkt, daß

η = Gesamtviskosität des untersuchten Serums,

η_m = Gesamtviskosität des Normalserums gleicher (maßanalytisch ermittelter) Eiweißkonzentration,

1,0 = Viskosität des Wassers,

0,02 = mittlere Viskosität der Nichteiweißkörper,

BJ = Gesamtrefraktion des untersuchten Serums, ausgedrückt in Einheiten des Brechungsindex,

BJ_{RR} = Refraktion der Nichteiweißkörper (Restrefraktion),

1,333 20 = Refraktion des Wassers,

g-Proz. E = (maßanalytisch ermittelte) Eiweißkonzentration in Grammprozenten bedeutet;

I. unter Annahme der Eiweißrefraktion als Vergleichsbasis:

$$\frac{\eta - 1{,}02}{BJ - BJ_{RR} - 1{,}33320};$$

II. unter Annahme gleicher tatsächlich bestehender Eiweißkonzentration als Vergleichsbasis: Der absolute Viskositätswert des Serums bei bestimmter einheitlicher Eiweißkonzentration;

III. unter Annahme gleicher rechnerisch supponierter Eiweißkonzentration als Vergleichsbasis:

$$\frac{\eta - 1{,}02}{\text{g-Proz.}\,E};$$

IV. unter Annahme der Viskosität eiweißgleichkonzentrierten Normalserums als Vergleichsbasis:

$$\frac{\eta - 1{,}02}{\eta_m - 1{,}02}.$$

Es entspricht also (unter Beseitigung der ausschaltbaren Fehlerquellen):

Ausdruck I dem Prinzip des Ausdrucks von *Bircher*; die Fehlermöglichkeit der Inkonstanz der Vergleichsbasis bleibt jedoch bestehen;

Ausdruck II dem Ausdruck von *Rusznyak*; wird die Forderung, daß die Einstellung des Serums auf einheitlich-gleiche (z. B.: 10 proz.) Konzentration die kolloide Struktur der Eiweißkörper nicht verändern darf, erfüllt, so muß der so gewonnene Wert als theoretisch einwandfrei bezeichnet werden; (die technische Schwierigkeit der Versuchsanordnung bedeutet keinen *grundsätzlichen* Einwand, wird jedoch praktisch ausschlaggebend sein);

Ausdruck III dem Prinzip des zweiten Ausdrucks von *Petschacher*; die Inkonstanz der Vergleichsbasis bleibt jedoch bestehen;

Ausdruck IV dem Prinzip des Ausdrucks von *Hellwig-Neuschloss* bzw. *P. Spiro* und *Hafner*; der so gewonnene Wert muß als theoretisch und praktisch-methodisch durchaus einwandsfrei gelten.

An Stelle der Viskosität des jeweils untersuchten enteiweißten Serums (1,02 — max. 1,04) wurde der mittlere Viskositätswert enteiweißten Normalserums gesetzt; die Begründung wurde bereits bei Kritik des *Hafner*schen Ausdrucks durchgeführt. Eventuell könnte bei ausgesprochener Urämie und Hyperglykämie der Wert 1,03 eingeführt werden.

Zusammenfassend darf also festgestellt werden, daß nur der vierte Ausdruck, der als Modifikation des Ausdrucks von *Hellwig-Neuschloss* aufgefaßt werden darf, allen theoretischen Anforderungen zu entsprechen vermag und mithin den Richtungswert für die Beurteilung der Verwendbarkeit aller anderen Ausdrücke darstellen muß.

Hinsichtlich der Benennung der vorliegenden Ausdrucksbegriffe scheint in Anbetracht der vielen bereits geprägten Bezeichnungen die Forderung nach Einheitlichkeit auf sachlich richtiger Grundlage begründet.

Sachlich unrichtig scheint uns die Verwendung des Begriffs spezifische Viskosität zur Bezeichnung des Ausdrucks IV (im Sinne von *Spiro*, *Hellwig-Neuschloss*), da im Begriffe: „spezifisch" entsprechend der herrschenden physikalischen und chemischen Ausdrucksweise essentiell die Beziehung auf 1 g-Proz. Konzentration enthalten liegt; diese Bezeichnung würde daher sachlich eher auf Ausdruck III passen. Die Bezeichnung: „Viskositätsfaktor" wurde von den Autoren bereits selbst aufgegeben; die Bezeichnung: „Zustandsviskosität" scheint insofern nicht gut gewählt, als sie die Ursache der Viskositätsänderung präjudizierlich (auf hypothetischer Grundlage) festlegt.

Ser. Nr.	η	G_E in g-Proz.			BJ − 1.33320	$BJ-BJ_{RR}$ − 1.33320	AHF : AGF	Glob. : Alb
		grav.	*Rob.*	*Reich.*	η_D		grav.	*Rohr.*
1	1,84	5,2	6,3	8,0	1644	1346	60 : 40	55 : 45
2	1,97	7,0	—	8,4	1720	—	—	65 : 35
3	1,85	4,2	6,3	7,9	1627	1357	43 : 57	55 : 45
4	1,53	4,1	—	6,2	1380	—	32 : 68	25 : 75
5	1,78	6,0	7,3	8,1	1673	1427	47 : 53	40 : 60
6	1,58	4,6	—	6,2	1341	—	—	30 : 70
7	1,88	7,0	7,0	8,1	1671	1425	—	55 : 45
8	1,74	6,1	—	7,7	1594	—	—	40 : 60
9	1,67	5,6	—	6,6	1419	—	—	60 : 40
10	1,84	7,0	6,4	7,7	1609	1367	76 : 24	55 : 45
11	1,70	6,0	6,8	7,4	1551	1325	45 : 55	40 : 60
12	1,73	6,3	7,4	8,6	1753	1521	37 : 63	25 : 75
13	1,91	7,3	7,5	8,8	1790	1558	41 : 59	45 : 55
14	2,04	8,2	8,9	9,7	1944	1774	—	45 : 55
15	1,82	7,2	8,5	8,9	1799	1555	47 : 53	30 : 70
16	1,68	6,2	7,8	8,1	1675	1413	37 : 63	20 : 80
17	1,70	6,4	8,0	8,4	1723	1457	30 : 70	20 : 80
18	1,70	6,4	—	7,9	1662	—	—	30 : 70
19	1,68	6,3	7,4	8,0	1649	1491	43 : 57	25 : 75
20	1,64	6,0	7,2	7,8	1610	1368	45 : 55	25 : 75
21	1,72	6,6	6,6	7,1	1667	1361	—	50 : 50
22	1,75	6,9	—	8,5	1742	—	—	30 : 70
23	1,63	6,0	—	7,5	1560	—	—	25 : 75
24	1,71	6,7	7,0	8,2	1678	1438	35 : 65	30 : 70
25	1,74	7,2	—	8,4	1720	—	—	30 : 70
26	1,57	5,7	—	7,1	1497	—	—	20 : 80
27	1,67	6,7	—	8,0	1657	—	—	25 : 75
28	1,74	7,3	7,8	8,5	1747	1529	34 : 66	25 : 75
29	1,60	6,2	5,7	6,3	1367	1129	—	45 : 55
30	1,65	6,6	—	7,9	1627	—	—	25 : 75
31	1,72	5,9	7,2	8,3	1708	1484	41 : 59	25 : 75
32	1,74	7,5	7,8	8,4	1721	1481	38 : 62	30 : 70
33	1,69	7,2	7,2	7,9	1613	1401	—	30 : 70
34	1,81	6,4	8,4	9,9	1985	1679	—	15 : 85
35	1,77	8,2	8,3	8,8	1792	1556	43 : 57	25 : 75
36	1,65	7,5	7,2	7,9	1634	1394	33 : 67	20 : 80
37	1,67	7,3	7,4	8,0	1658	1426	36 : 64	25 : 75
38	1,70	8,0	7,6	8,1	1666	1454	44 : 56	30 : 70
39	1,56	7,8	—	7,5	1561	—	—	15 : 85

Wir möchten daher für die vorliegenden typisch-formulierten Ausdrücke folgende Bezeichnungen vorschlagen, welche lediglich das jeweils als Grundlage dienende Vergleichsprinzip klar zur Darstellung bringen sollen:

für Ausdruck I die ursprüngliche Bezeichnung: Viskositäts-Refraktionsquotient;

für Ausdruck II die ursprüngliche Bezeichnung: Reduzierte Viskosität;

für Ausdruck III in Übereinstimmung mit dem Vorschlage *Hafners* die Bezeichnung: Viskositäts-Konzentrationsquotient;

für Ausdruck IV die Bezeichnung: *Relative Viskosität*.

I			II		III		
1	2	3	1	2	1	2	3
1,82	1,25	1,07	0,158	0,130	60,9	51,1	318
1,48	1,19	1,12	0,136	—	—	56,4	307
1,48	1,17	1,08	0,193	0,132	61,1	42,8	314
1,44	1,12	1,00	0,124	—	—	38,4	336
1,43	1,15	1,01	0,127	0,104	53,3	46,6	333
1,43	1,12	1,03	0,122	—	—	43,3	318
1,34	1,13	1,13	0,123	0,123	60,4	52,7	315
1,33	1,12	1,03	0,118	—	—	46,4	328
1,30	1,10	1,06	0,116	—	—	47,2	314
1,28	1,11	1,09	0,117	0,128	60,0	52,2	313
1,28	1,10	1,03	0,113	0,100	51,3	45,1	329
1,27	1,09	0,97	0,113	0,096	46,7	41,6	355
1,24	1,10	1,06	0,122	0,119	57,1	50,8	327
1,21	1,09	1,06	0,124	0,115	57,5	53,8	326
1,20	1,08	1,00	0,111	0,094	51,4	45,6	345
1,20	1,07	0,97	0,106	0,085	46,7	40,6	353
1,20	1,07	0,97	0,106	0,085	46,7	40,6	356
1,20	1,07	0,99	0,106	—	—	42,6	344
1,18	1,06	0,98	0,105	0,089	44,3	41,2	349
1,17	1,06	0,97	0,103	0,086	45,3	39,9	351
1,17	1,06	1,06	0,106	0,106	51,0	44,8	334
1,16	1,06	0,98	0,105	—	—	43,1	349
1,15	1,05	0,98	0,102	—	—	40,4	345
1,14	1,05	0,98	0,103	0,099	48,0	42,0	347
1,13	1,04	0,99	0,103	—	—	43,0	348
1,10	1,03	0,97	0,097	—	—	38,1	347
1,06	1,03	0,97	0,097	—	—	40,3	352
1,06	1,02	0,98	0,099	0,092	47,1	42,4	352
1,05	1,02	1,04	0,094	0,101	51,4	43,9	325
1,05	1,02	0,96	0,095	—	—	40,0	352
1,05	1,02	0,98	0,119	0,097	47,2	42,2	350
1,00	1,00	0,99	0,096	0,092	48,6	43,0	348
1,00	1,00	0,99	0,093	0,093	47,8	42,8	344
0,90	0,95	0,97	0,124	0,094	47,1	40,0	374
0,88	0,95	0,98	0,092	0,090	48,2	43,0	353
0,87	0,95	0,97	0,084	0,088	45,2	39,7	353
0,86	0,94	0,97	0,089	0,088	45,6	40,4	353
0,83	0,93	0,98	0,085	0,090	46,8	42,0	348
0,70	0,87	0,93	0,069	—	—	35,9	360

Die experimentelle Prüfung des Verhaltens der Serumeiweißkörper mit Hilfe der im vorstehenden grundsätzlich theoretisch geprüften Methodik hatte folgendes Ergebnis:

Versuchsanordnung: Verwendung nur klaren, frischen, hämoglobinfreien Serums; Bestimmung der Viskosität mittels des *Ostwald*schen Viskosimeters;

jeweils Bestimmung der Gesamtrefraktion, der Restrefraktion (nach *Robertson*), der Eiweißkonzentration einerseits nach *Robertson*, andererseits auf gravimetrischer Grundlage (s. erste Mitteilung über die Maßanalyse der Serumeiweißkörpergruppen), und der Gesamtviskosität;

zur Bestimmung der Viskosität eiweißgleichkonzentrierten Normalserums Verwendung der Tabellen von *Hellwig-Neuschloss*.

Auf Grund dieser Werte konnten folgende Resultate festgestellt und miteinander verglichen werden:

I. 1. Die relative Viskosität der Serumeiweißkörper;
   2. die spezifische Viskosität nach *Hellwig-Neuschloss*;
   3. die spezifische Viskosität nach *P. Spiro*.

II. 1. Der Viskositäts-Konzentrationsquotient der Serumeiweißkörper;
   2. die spezifische Viskositätserhöhung der Serumeiweißkörper nach *Petschacher*;

III. 1. Der Viskositäts-Refraktionsquotient der Serumeiweißkörper;
   2. der Viskositäts-Refraktionsquotient des Vollserums nach Abzug des Wasserwertes;
   3. der Refraktions-Viskositätsquotient des Vollserums nach *Bircher*.

Von der vergleichenden Bestimmung auch der reduzierten Viskosität nach *Rusznyak* mußte aus technischen Gründen (zu großer Serumverbrauch) Abstand genommen werden.

Die spezifische Viskosität des Serumproteins nach *Petschacher* und der identische Ausdruck von *Hafner* finden in der Tabelle keine Berücksichtigung, da sie durch die später vorgeschlagenen Ausdrücke der gleichen Autoren als überholt angesehen werden müssen.

Die Zustandsviskosität *Hafners* schließlich konnte nicht dargestellt werden, da die Viskosität des enteiweißten Serums von uns auf Grund der im vorigen durchgeführten Überlegungen nicht bestimmt wurde.

Zu Vergleichszwecken wurden ferner die *Rohrer*schen[1]) Werte für das „Globulin/Albumin“-Verhältnis errechnet und, wenn möglich, auch die Bestimmung des wirklichen Verhältnisses der Am_2SO_4-Halb- und Ganzsättigungsfraktion (AHF, AGF) auf gravimetrischer Grundlage durchgeführt.

Der Vergleich des Wertes für die relative Viskosität als Richtungswert der Beurteilung mit den Werten der anderen Ausdrücke darf demnach feststellen:

1. Für Ausdruck I, 2. (spezifische Viskosität nach *Hellwig-Neuschloss*) qualitativ sehr gute Übereinstimmung in dem Sinne, als höchste und niedrigste Werte einander im Rahmen kontinuierlichen Übergangs (von wenigen Ausnahmen abgesehen) völlig entsprechen; quantitativ-relativ keine Übereinstimmung, da das wirkliche Ausmaß der auf die Eiweißveränderung bezüglichen Viskositätsabweichung nur im Ausdruck I, 1. Darstellung findet. nicht aber in Ausdruck I, 2., wo die Größe des Ausschlags infolge der Einbeziehung des Wasserwertes erhebliche Verminderung erfährt: der jeweils größte und kleinste beobachtete Wert betragen für Ausdruck I, 1.: 1,82 bis 0,70, für Ausdruck I, 2.:

[1]) *Rohrer*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 1921.

1,25 bis 0,87, stehen also zueinander im Verhältnis von 100 : 38 bzw. 100 : 70.

2. Für Ausdruck I, 3. (spezifische Viskosität nach *Spiro*) qualitativ nur *annähernde* Übereinstimmung bei vielfach sehr großer Abweichung im Einzelfalle, ein Ergebnis, welches in der Verwendung der refraktometrischen Eiweißbestimmung und *Naegeli*schen Tabellen begründet liegt; beobachtete Ausschlagsbreite zwischen 1,12 bis 0,93 entsprechend einem Verhältnis von 100 : 83.

3. Für Ausdruck II, 1 (Viskositäts-Konzentrationsquotient) qualitativ ebenfalls nur annähernde Übereinstimmung bei vorhandener relativ geringer Abweichung im Einzelfall auf Grund der Inkonstanz der Vergleichsbasis; beobachtete Ausschlagsbreite zwischen 0,158 bis 0,069 entsprechend einem Verhältnis von 100 : 44.

4. Für Ausdruck II, 2. (spezifische Viskositätserhöhung nach *Petschacher*) ein grundsätzlich gleiches Ergebnis bei stärkerer Abweichung im Einzelfalle infolge der Differenz zwischen maßanalytisch und nach *Robertson* bestimmter Eiweißkonzentration; ferner ein allgemein tieferes Wertniveau als bei Ausdruck II, 1. auf Grund des jeweils größeren Wertergebnisses der *Robertson*schen Methode. Ausschlagsbreite zwischen 0,132 bis 0,088 entsprechend einem Verhältnisse von 100 : 66.

5. Für Ausdruck III, 1. (Viskositäts-Refraktionsquotient) ebenfalls annähernde qualitative Übereinstimmung bei vielfach starker Abweichung im Einzelfalle infolge der Inkonstanz der Vergleichsbasis; beobachtete Ausschlagsbreite zwischen 61,1 bis 45,6 entsprechend einem Verhältnis von 100 : 75.

6. Für Ausdruck III, 2. (Viskositäts-Refraktionsquotient ohne Berücksichtigung der Restrefraktion) ein grundsätzlich gleiches Ergebnis bei stärkerer Abweichung im Einzelfalle; beobachtete Ausschlagsbreite 56,4 bis 35,9 entsprechend einem Verhältnis von 100 : 70.

7. Für Ausdruck III, 3. (Viskositäts-Refraktionsquotient nach *Bircher*) ein grundsätzlich gleiches Ergebnis bei noch stärkerer Abweichung im Einzelfall; beobachtete Ausschlagsbreite 307 bis 374 entsprechend einem Verhältnis von 82 : 100.

Auf Grund dieser experimentellen Ergebnisse, die dem theoretisch erwarteten vollkommen entsprechen, darf also die Verwendung der relativen Viskosität als auch für den praktischen Zweck als bestgeeignete bezeichnet werden, da sie die Veränderung der Eiweißkörper und nur dieser in größten Ausschlägen darzustellen vermag.

Was schließlich die Fragestellung anlangt, welche Schlüsse aus dem Verhalten der relativen Viskosität gezogen werden dürfen, so darf jedenfalls als sicher angenommen werden, daß verschiedene Ursachen ein An- und Absteigen der relativen Viskositätsgröße vorübergehender und dauernder Art bewirken können: Als solche kommen in Frage

mannigfaltige Änderungen der chemisch-konstitutiven und physikalisch-strukturellen Natur der Eiweißkörper, die wir jedoch nicht, wie üblich, als gegensätzlich eingestellt, sondern als wechselseitig bedingt auffassen möchten.

Als Ursache der relativen Viskositätsänderungen Verschiebungen der Verhältnisse der Neutralsalzfraktionen (der sogenannten Globuline und Albumine) anzunehmen, scheint von vornherein insofern nicht folgerichtig, als beide Phänomene: Fraktionsverschiebung und relative Viskositätsänderung, an sich als gleichgeordnet, nicht über- bzw. untergeordnet zu beurteilen sind, also *neben*einander vorkommen können, jedoch nicht müssen.

Tatsächlich ergibt der experimentelle Vergleich keine gesetzmäßige Beziehung zwischen dem Verhältnis der Am_2SO_4-Ganz- und Halbsättigungsfraktion (bzw. den *Rohrer*schen Werten für das Verhältnis der Globuline zu den Albuminen) einerseits und den Werten der relativen Viskosität andererseits, wie schon *Neuschloss* und *Trelles*[1]) feststellen konnten und auch aus unseren Untersuchungen eindeutig hervorgeht.

Es scheint daher berechtigt, besonders darauf hinzuweisen, daß die Feststellung der relativen Viskosität niemals als einziges Untersuchungsverfahren Anwendung finden darf, wenn der physikalisch-chemische Zustand von Serumeiweiß eingehender Analyse zugeführt werden soll, wie ja auch sonst das Ergebnis *einer* Untersuchungsmethodik niemals Aufschluß über Ursachen und Wesen einer komplexen Erscheinung zu geben imstande ist.

---

[1]) *Neuschloss* und *Trelles*, Klin. Wochenschr. 1923, S. 45.

Die Wirkung von Calcium auf das Säure-Basen-Gleichgewicht des Menschen.

Von

J. Holló und **St. Weiss.**

(Aus der I. medizinischen Klinik der „Pázmány-Péter"-Universität Budapest.)

(Eingegangen am 12. Mai 1925.)

Trotz der anregenden Arbeiten von *György*[1]) sowie von *Gollwitzer-Meier*[2]) sind unseres Wissens bisher noch keine systematischen Versuche über die Wirkung von Ca in therapeutischen Dosen auf das Säurebasengleichgewicht des Menschen, speziell auf die Zusammensetzung des Blutes, mitgeteilt worden. Nur die Arbeit von *Gamble, Ross* und *Tisdall*[3]) kann erwähnt werden, die bei *einem* gesunden und *einem* tetanischen Säugling nach peroral zugeführtem $CaCl_2$ eine deutliche Abnahme des Plasmabicarbonatgehalts gefunden haben.

Unsere eigenen Versuche beziehen sich auf Veränderungen, die in der Wasserstoffzahl des Blutes, im Bicarbonatgehalt des Plasmas, sowie in der CO_2-Spannung der Alveolarluft bei Erwachsenen nach Ca-Medikation auftreten.

I. Intravenöse Versuche.

Die Versuche wurden an Patienten bzw. Beobachteten der Klinik vorgenommen, bei denen keine Störungen des Säurebasengleichgewichts vorlagen.

Die Versuche sind vormittags und nüchtern ausgeführt worden; die Versuchspersonen lagen während des Versuchs zu Bett. Zur Bestimmung der Wasserstoffzahl[4]) des Bicarbonatgehalts[5]) sowie der alveolaren CO_2-

[1]) Die Kalkbehandlung der Tetanie ist eine Säuretherapie, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 28.

[2]) Abhängigkeit der Erregbarkeit des Atemzentrums von dem Gleichgewicht bestimmter Ionen im Blute, diese Zeitschr. **151**, 54, 1924.

[3]) Ref. in Ronas Ber. **24**, 81.

[4]) Diese Zeitschr. **144**, 15.

[5]) Ebendaselbst **150**, 501, 1924.

Spannung[1]) haben wir die Methoden von *Holló* und *Weiss* benutzt. Es wurde Venenblut und „venöse" „geschlossene" alveolare CO_2-Spannung untersucht.

Die Versuche wurden nicht eher begonnen, bevor wir uns durch wiederholte Bestimmungen über die Konstanz der alveolaren CO_2-Spannung überzeugt haben; dann erst erfolgte die erste Blutentnahme und gleichzeitig die 1 bis 2 Minuten dauernde Injektion. Die alveolare CO_2-Spannung wurde nach der Injektion alle 3 bis 6 Minuten untersucht; die zweite Blutentnahme geschah möglichst zur Zeit der maximalen Änderung der CO_2-Spannung. Während des Versuchs wurde jede Bewegung und Aufregung vermieden.

Tabelle I.

Intravenöse Injektion von 10 ccm 10proz. $CaCl_2$-Lösung (1 g $CaCl_2$ siccum).

Nr.	Vor		Nach	
1	Alveolare CO_2, mm	47	3′ 8 14	48,5 50,5 51,0
	Plasmabicarbonat, Vol.-Proz.	66,5	12	64,5
	Blut-p_H (18°C) (Mittelwert aus 3 Bestimmungen)	7,60	12	7,54
2	Alveolare CO_2, mm	47,5	5 10 15 22	47,0 49,5 51,0 50,0
	Plasmabicarbonat, Vol-Proz.	66	20	63
	Blut-p_H (18°C) (Mittelwert aus 3 Bestimmungen)	7,59	20	7,55
3	Alveolare CO_2, mm	46,5	4 8 12	47,0 47,5 47,0
	Plasmabicarbonat, Vol-Proz.	68	15	65
	Blut-p_H (18°C) (Mittelwert aus 3 Bestimmungen)	7,60	15	7,58
4	Alveolare CO_2, mm	48,5	3 8 14	50,0 51,5 50,0
	Plasmabicarbonat, Vol.-Proz.	71,0	12	69
	Blut-p_H (18°C) (Mittelwert aus 3 Bestimmungen)	7,60	12	7,60

Um die Wirkung der hypertonischen Salzlösung an und für sich möglichst in unseren Versuchen auszuschalten, haben wir mit derselben Methodik und Kautelen Kontrollversuche mit hypertonischer NaCl-Lösung gemacht; bei Menschen sind unseres Wissens nach keine solche Versuche mitgeteilt, in Tierversuchen fand *Odaira*[2]) eine Abnahme des Plasmabicarbonatgehalts.

---

[1]) Zeitschr. f. klin. Med. 98.

[2]) Ref. in Ronas Ber. 26, 438.

Tabelle II.

Intravenöse Injektion von 20 ccm n NaCl-Lösung (1,17 g NaCl).

Nr.	Vor		Nach	
1	Alveolare CO_2, mm	49,5	3′ 8 11 15	50 50 49,5 49,5
	Plasmabicarbonat, Vol.-Proz.	72,0	12	66
	Blut-p_H (18°C) . . . . (Mittelwert aus 3 Bestimmungen)	7,61	12	7,57
2	Alveolare CO_2, mm	48	2 6 11	47,5 48,5 49,0
	Plasmabicarbonat, Vol.-Proz.	69	10	63,5
	Blut-p_H (18°C) . . . . (Mittelwert aus 3 Bestimmungen)	7,59	10	7,56
3	Alveolare CO_2, mm	47	2 7 13	46,5 47,5 46,5
	Plasmabicarbonat, Vol.-Proz.	74	11	72
	Blut-p_H (18°C) . . . . (Mittelwert aus 3 Bestimmungen)	7,62	11	7,62

Intravenöse Injektion von 1 g $CaCl_2$ in hypertonischer Lösung vermindert also deutlich den Bicarbonatgehalt des Plasmas. Trotzdem zeigt die alveolare CO_2-Spannung eine geringe Steigerung, so daß die H-Zahl des Blutes etwas ansteigt, wie das auch durch direkte Messungen nachgewiesen wurde. Der größte Anstieg beträgt $- 0{,}06\ p_H = 15$ Proz., ist also, wenn auch außerhalb der Fehlergrenzen der Methode, nicht sehr bedeutend.

Auch die intravenöse Injektion von hypertonischer NaCl-Lösung vermindert, und zwar nicht weniger deutlich, den Plasmabicarbonatgehalt. Eine Änderung der alveolaren CO_2-Spannung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, die von uns registrierten kleinen Schwankungen liegen innerhalb der Fehlergrenze unserer Methode. Eine geringe Zunahme der Wasserstoffzahl des Blutes ist nur unsicher nachweisbar.

Die Verminderung des Plasmabicarbonatgehalts nach hypertonischer Salzinfusion ist wahrscheinlich auf eine Verdrängung der Bicarbonate im Dienste der osmotischen Blutregulation zu deuten [*Essen*, *Kauders* und *Porges*[1]]. Die Erhöhung der alveolaren CO_2-Spannung und somit der Wasserstoffzahl des Blutes muß jedoch mit einer zentral-nervösen Wirkung des Ca auf das Atemzentrum erklärt werden. Ob auch dem Kochsalz eine zentrogene Wirkung zukommt, kann aus unseren Versuchen nicht entschieden werden.

[1]) Deutsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 47.

Unsere Befunde und Folgerungen stimmen völlig mit jenen überein, die *Gollwitzer-Meier*[1]) an Kaninchen und mit anderen Methoden erhoben hat.

II. Perorale Versuche.

Als Ergänzung haben wir perorale Versuche ausgeführt, und zwar mit $CaCl_2$ (siccum) und mit Ca lacticum. Aus beiden Salzen wurden 3 Tage lang täglich 10 g gegeben, am Morgen des vierten Tages, 1 bis 2 Stunden vor der zweiten Untersuchung, noch 3 g. Es ist uns nicht gelungen — auch von Ca lacticum nicht — größere Dosen zu geben, an diesem unseren Bestreben sind mehrere Versuche gescheitert; das ist der Grund, daß die Ca lacticum-Versuche mit weniger Ca-Gehalt ausgeführt wurden als die $CaCl_2$-Versuche. Sonstige Methodik siehe unter Tabelle I.

Tabelle III.
Perorale Einnahme von täglich 10 g $CaCl_2$ siccum während 3 Tagen.

Nr.		Vor	Nach
1	Alveolare CO_2, mm	47	48
	Plasmabicarbonat, Vol.-Proz.	68,5	65
	Blut-p_H (18°C)	7,56	7,55
	(Mittelwert aus 3 Bestimmungen)		
2	Alveolare CO_2, mm	49	48
	Plasmabicarbonat, Vol.-Proz.	74	65
	Blut-p_H (18°C)	7,58	7,57
	(Mittelwert aus 3 Bestimmungen)		
3	Alveolare CO_2, mm	45,5	51,0
	Plasmabicarbonat, Vol.-Proz.	72	67,5
	Blut-p_H (18°C)	7,57	7,51
	(Mittelwert aus 3 Bestimmungen)		

Tabelle IV.
Perorale Einnahme von täglich 10 g Ca lacticum 3 Tage lang.

Nr.		Vor	Nach
1	Alveolare CO_2, mm	49,0	50,5
	Plasmabicarbonat, Vol.-Proz.	72	70
	Blut-p_H (18°C)	7,54	7,54
	(Mittelwert aus 3 Bestimmungen)		
2	Alveolare CO_2, mm	44,5	43
	Plasmabicarbonat, Vol.-Proz.	70	60
	Blut-p_H (18°C)	7,59	7,57
	(Mittelwert aus 3 Bestimmungen)		
3	Alveolare CO_2, mm	43,5	41
	Plasmabicarbonat, Vol.-Proz.	67,0	58,5
	Blut-p_H (18°C)	7,58	7,57
	(Mittelwert aus 3 Bestimmungen)		

[1]) l. c.

Die Plasmabicarbonatkonzentration nimmt nach beiden Ca-Salzen deutlich ab; eine direkte Wirkung auf die alveolare CO_2-Spannung sowie auf die Wasserstoffzahl des Blutes ist nur in Versuch 3, nach $CaCl_2$, entschieden nachweisbar, und zwar ist eine Zunahme sowohl der alveolaren CO_2-Spannung als der Wasserstoffzahl zu ersehen. Es muß dahingestellt bleiben, wieweit die gefundenen Veränderungen als spezifische Ca-Wirkungen oder aber als unspezifische Säurewirkung (infolge Fällung alkalischer Valenzen durch das Ca im Sinne von *György*) aufzufassen sind. Gegen die alleinige Bedeutung dieser letzteren Möglichkeit scheint allerdings der Umstand zu sprechen, daß die Abnahme der Plasmabicarbonatkonzentration auch nach Ca lacticum, also einem Salz mit verbrennbarem Säureradikal, auftritt, und ebenso nach *intravenöser* Verabreichung von $CaCl_2$, ja sogar von NaCl nachzuweisen ist.

Auf die Theorie der therapeutischen Wirkung des Ca, speziell bei Tetanie, möchten wir bei dieser Gelegenheit nicht eingehen, da dazu unseres Erachtens eine viel breitere experimentelle Basis notwendig ist.

Zusammenfassung.

Intravenös gegebene hypertonische $CaCl_2$-Lösung in therapeutischen Dosen vermindert den Bicarbonatgehalt des Plasmas, erhöht die alveolare CO_2-Spannung sowie die Wasserstoffzahl des Blutes. Diese Wirkung kann nicht ganz allein auf die hypertonische Salzlösung als solche bezogen werden.

Auch peroral gegebenes $CaCl_2$, aber auch Ca lacticum vermindert den Bicarbonatgehalt des Plasmas; eine direkte Beeinflussung der alveolaren CO_2-Spannung oder eine Ansäuerung des Blutes ist dabei nur unsicher nachweisbar.

Über die spezifische Wirkung der Kohlensäure auf das Atemzentrum des Menschen und des Kaninchens.

Von

St. Hetényi, J. Holló und **St. Weiss.**

(Aus der I. medizinischen Klinik der Pázmány-Péter-Universität Budapest.)

(Eingegangen am 12. Mai 1925.)

Seit den Arbeiten von *Winterstein*[1]) sowie von *Laqueur* und *Verzár*[2]) ist viel darüber diskutiert worden, ob die Wasserstoffionenkonzentration des Blutes den alleinigen chemischen Atmungsreiz darstellt oder ob auch den Anionen bzw. den undissoziierten Säuren dabei eine Bedeutung zukommt. Bei diesen Diskussionen steht besonders die Frage nach der spezifischen Bedeutung der Kohlensäure im Vordergrund, da durch die Atmung vor allem die Konzentration gerade dieses Blutbestandteils beeinflußt wird.

Zu ihrer Klärung sind in neuerer Zeit vielfach Tierversuche gemacht worden, und zwar mit dem Ergebnis, daß die Kohlensäure eine spezifisch erregende Wirkung auf das Atemzentrum ausübt. [Literatur siehe bei *R. Gesell*[3]), sowie bei *Gollwitzer-Meier*[4])]. Nach *Gollwitzer-Meier*, der wir auch schöne eigene Versuche an Kaninchen verdanken, soll das speziell bei alkalischer Blutreaktion so sein. Brauchbare Versuche an *Menschen* sind jedoch unseres Wissens bisher noch nicht mitgeteilt worden.

I.

Unsere eigenen diesbezüglichen Versuche an Menschen sind nach einem sehr einfachen Plane ausgeführt, der sich aber zur Entscheidung der aufgeworfenen Frage als geeignet und ausreichend erwies. Wir haben Menschen intravenöse Injektionen von $NaHCO_3$-Lösungen gegeben und dabei in acht Versuchen, mit einer Ausnahme, eine Abnahme der Wasserstoffzahl des Blutes, zugleich aber, und zwar in allen Fällen, eine Senkung der alveolaren CO_2-Spannung gefunden; der Bicarbonatgehalt des Plasmas ist zur Zeit der zweiten Blutuntersuchung, also 7 bis 19 Minuten nach der Injektion, meistens noch deutlich erhöht.

[1]) Arch. f. d. ges. Phys. **138**.
[2]) Ebendaselbst **143**.
[3]) The Amer. Journ. of Phys. **66**.
[4]) Diese Zeitschr. **151**.

Da ganz ähnlich ausgeführte Kontrollversuche mit gleichkonzentrierter NaCl-Lösung — auf deren Mitteilung wir hier verzichten, da sie in der vorangehenden Arbeit von *Holló* und *Weiss* ausführlich gebracht sind — etwas Ähnliches nicht erkennen lassen, so kann aus diesen Versuchen, speziell aus dem *Sinken der alveolaren CO_2-Spannung trotz primärer alkalischer Verschiebung der Blutreaktion durch die Bicarbonatinjektion* auf eine spezifische Erregung des Atemzentrums durch die Kohlensäure geschlossen werden. Und eben weil die alveolare CO_2-Spannung und somit auch der Gehalt des Blutes an undissoziierter, sogenannter „freier" Kohlensäure während des Versuchs erniedrigt gefunden wurde, so ist es naheliegend, die erregende Wirkung nicht der freien Kohlensäure, sondern den dissoziierten HCO_3-Ionen zuzuschreiben. Sicher läßt sich das aus den mitgeteilten Versuchen allerdings nicht entscheiden; denn bei der kurzen Versuchsdauer ist auch die andere Auffassung berechtigt, daß nämlich die gefundene Senkung der CO_2-Spannung als eine überschießende Spätwirkung der sofort nach der Bicarbonatinjektion infolge Pufferwirkung des Blutes auftretenden und eigentlich erregenden Zunahme der undissoziierten, freien Kohlensäure aufzufassen sei.

Protokolle.

Es wurde dieselbe Technik benutzt, die in der vorangehenden Arbeit von *Holló* und *Weiss* zur Untersuchung der Ca-Wirkung ausführlich mitgeteilt wurde. Die dort mitgeteilten Versuche mit hypertonischer Kochsalzlösung können auch zu diesen Versuchen als Kontrollen dienen.

Tabelle I.

Intravenöse Injektion von 20 ccm n $NaHCO_3$-Lösung[1]).

Nr.	Zeit Min.	Alveolare CO_2-Spannung mm	Blut-p_H (18°C) (Mittelwert a. 3 Kontrollbestimmungen)	Plasma-bicarbonat Vol.-Proz.	Nr.	Zeit Min.	Alveolare CO_2-Spannung mm	Blut-p_H (18°C) (Mittelwert a. 3 Kontrollbestimmungen)	Plasma-bicarbonat Vol.-Proz.
1	0	46	7,57	71,5	3	(Anaemia perniciosa)			
	2	52	—	—		0	37	7,73	—
	4	48,5	—	—		3	41	—	—
	6	46,5	—	—		6	37,5	—	—
	8	43,5	—	—		8	32,5	—	—
	10	42,5	—	—		10	35	—	—
	19	—	7,61	75		12	37,5	—	—
	21	46	—	—		16	—	7,75	—
2	0	50	7,58	70	4[2])	0	42	7,58	—
	5	48	—	—		4	47	—	—
	7	46,5	—	—		7	43,5	—	—
	9	45	—	—		9	40	—	—
	10	—	7,60	75		12	41,5	—	—
	12	48,5	—	—		15	—	7,64	—

[1]) Das $NaHCO_3$ wurde trocken sterilisiert und in sterilem Wasser frisch gelöst, da sich eine $NaHCO_3$-Lösung beim Kochen zersetzt.

[2]) Erhielt 40 ccm n $NaHCO_3$-Lösung.

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr.	Zeit Min.	Alveolare CO_2-Spannung mm	Blut-p_H (18°C) (Mittelwert a. 3 Kontrollbestimmungen)	Plasmabicarbonat Vol.-Proz.	Nr.	Zeit Min.	Alveolare CO_2-Spannung mm	Blut-p_H (18°C) (Mittelwert a. 3. Kontrollbestimmungen)	Plasmabicarbonat Vol.-Proz.
5	0	39,5	7,61	64,5	7	0	53	7,53	68
	2	42,5	—	—		2	56	—	—
	5	40	—	—		4	53	—	—
	7	36	—	—		7	—	7,58	74,5
	10	35,5	—	—		8	51	—	—
	12	—	7,65	68		10	46	—	—
	15	36,5	—	—		15	50	—	—
6	0	50	7,58	73	8	0	46	7,60	73
	2	56	—	—		3	45	—	—
	4	46,5	—	—		5	43	—	—
	7	47,5	—	—		7	42,5	—	—
	10	—	7,56	73		10	—	7,63	73
	14	51	—	—		13	45,5	—	—
						15	46	—	—

II.

Aus unseren mitgeteilten Versuchen ist auch das ersichtlich, daß die Wirkung der Kohlensäure beim Menschen auch bei *normaler Blutreaktion* zutage tritt; denn die durch den Eingriff erniedrigte Wasserstoffzahl des Blutes bewegt sich noch innerhalb der normalen Grenzen und ihre Senkung ist jedenfalls nicht groß genug, um beim Zustandekommen der CO_2-Wirkung eine zwingende Bedeutung zu haben.

Zur Untersuchung der Frage nach der Bedeutung der Blutreaktion bzw. nach der Notwendigkeit einer alkalischen Blutreaktion zur Entfaltung einer spezifischen Reizwirkung durch die Kohlensäure, haben wir außerdem auf dieses Ziel gerichtete Tierversuche ausgeführt. Wir haben Kaninchen Mischungen von $NaHCO_3$ und H_2CO_3 intravenös injiziert, deren Reaktion der Blutreaktion der Tiere gleich oder noch saurer war. Die Untersuchung der Blutreaktion vor und nach der Injektion ergab eine deutliche, wenn auch geringe, alkalische Verschiebung, die — wegen der eher etwas sauren Reaktion des injizierten Gemisches — unmöglich eine direkt chemisch bedingte Folge des Eingriffes sein kann, und die nur durch die zentral-erregende Wirkung der Kohlensäure, und zwar bei normaler Blutreaktion, zu deuten ist. Allerdings ist diese Wirkung nicht so groß, wie sie *Gollwitzer-Meier*[1]) für Kaninchen, aber bei alkalischer Blutreaktion, fand.

Protokolle.

Die Versuche wurden an Kaninchen ohne jede Betäubung vorgenommen. Das Blut wurde vor und nach jeder Injektion durch Punktion aus dem

[1]) Diese Zeitschr. **151**, 424, 1924.

linken Herzen genommen, und zwar 2,5 bis 3,5 ccm; nur einmal, wo auch der Plasmabicarbonatgehalt bestimmt wurde, haben wir 6 ccm entnommen. Die Injektion geschah in eine Ohrvene; es wurde langsam, während 2 bis 3 Minuten injiziert.

Die injizierten Lösungen sind aus $NaHCO_3$- und HCl-Lösungen frisch in der Spritze selbst gemischt worden. Die Reaktion solcher Gemische ist wegen schnellen Entweichens von CO_2 sehr labil; zur Bestimmung der p_H wurde immer der Rest der Mischung *nach Injektion* aus der Spritze unter Paraffin aufgefangen und sofort und schnell kolorimetrisch untersucht. Die so erhaltene Wasserstoffzahl ist wahrscheinlich etwas niedriger als die der injizierten Flüssigkeit, da sie nach der Injektion bestimmt wurde. (Beim Vergleich der Blutreaktion des Tieres mit der angegebenen Reaktion des injizierten Gemischs darf nicht vergessen werden, daß unsere Blut-p_H-Werte für 18° C gelten, und daß die Reaktion des Blutes bei Körpertemperatur um etwa p_H 0,22 saurer ist als bei 18° C.)

Tabelle II.

1. Injiziert wurde ein Gemisch von 9 ccm ¾ n $NaHCO_3$ + 1 ccm ¾ n HCl; p_H = 7,25. Blut-p_H 18° C (Mittelwert aus drei Bestimmungen) vor Injektion = 7,53, 5 Minuten nach Beendigung der Injektion = 7,60. Plasmabicarbonat vor Injektion = 56 Vol.-Proz., nach Injektion 84 Proz.
2. 5 ccm n $NaHCO_3$ + 4 ccm n/10 HCl; p_H = 7,40. Blut-p_H (drei Kontrollen): vor Injektion = 7,55, 8 Minuten nach der Injektion = 7,61.
3. 5 ccm n $NaHCO_3$ + 6,5 ccm n/10 HCl; p_H = 7,20. Blut-p_H (vier Kontrollen): vor Injektion = 7,60, nach 9 Minuten = 7,63.
4. 5 ccm n $NaHCO_3$ + 6,5 ccm n/10 HCl; p_H = 7,20. Blut-p_H (vier Kontrollen): vor Injektion = 7,54, nach 7 Minuten 7,58.
5. 5 ccm n $NaHCO_3$ + 4 ccm n/10 HCl; p_H = 7,40. Blut-p_H (vier Kontrollen): vor Injektion = 7,59, nach 8 Minuten 7,62.

Zusammenfassung.

Nach intravenöser Injektion von 20 ccm n $NaHCO_3$-Lösung wurde beim Menschen eine Herabsetzung der Wasserstoffzahl des Blutes, zugleich aber auch der alveolaren CO_2-Spannung gefunden, woraus auf eine spezifisch-erregende Wirkung der Kohlensäure auf das Atemzentrum geschlossen wird.

In Versuchen an Kaninchen konnte nach intravenöser Infusion von $NaHCO_3 + H_2CO_3$-Gemischen, deren Reaktion der Blutreaktion der Tiere entsprach oder noch etwas saurer war, eine geringe alkalische Verschiebung der Blutreaktion konstatiert werden. Damit ist gezeigt, daß die erregende Wirksamkeit der Kohlensäure nicht unbedingt an eine alkalische Blutreaktion gebunden ist.

Über die antagonistische Beeinflussung der Hypophysendiurese durch Insulin.

Von

N. Klissiunis.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 14. Mai 1925.)

Im Anschluß an die Untersuchungen von *Joachimoglu* und *Metz*[1]), die nachgewiesen haben, daß die Insulinwirkung auf den Blutzucker durch Hypophysenpräparate sowie auch die Hypophysenwirkung auf den Uterus durch Insulin antagonistisch beeinflußt werden, lag es nahe, zu prüfen, ob auch die diuresehemmende Wirkung der Hypophysenpräparate durch Insulin aufgehoben wird.

Auf Veranlassung von Prof. *Joachimoglu* habe ich einige Versuche in dieser Richtung ausgeführt, die ich im folgenden kurz schildern werde.

Für die Versuche wurden weibliche Hunde mit einem Körpergewicht von 8 bis 13 kg benutzt. Jedes Tier wurde zu den eigentlichen Versuchen in der Weise vorbereitet, daß es nachmittags zwischen 4 und 5 Uhr nach Feststellung des Körpergewichts eine abgewogene Menge Futter erhielt. Das Futter bestand aus 200 g Fleisch, 150 g Reis, 800 g Wasser, 1 g Kochsalz. In den Tabellen ist vermerkt, wieviel von diesem Futter der Hund einnahm. Am nächsten Morgen um 9 Uhr wurde das Tier zuerst katheterisiert und gewogen, danach bekam es 500 ccm Wasser mit der Schlundsonde in den Magen. In den nächsten 4 bis 5 Stunden wurde die Harnblase stündlich mit dem Katheter entleert, und die gewonnenen Harnmengen gemessen, sowie auch ihr spezifisches Gewicht festgestellt. Unter normalen Verhältnissen, d. h. ohne Zufuhr von Hypophyse oder Insulin beträgt die Harnmenge zwischen 404 und 500 ccm, wie folgender Versuch zeigt:

Ein 12,2 kg schweres Tier bekam am Tage vor dem Versuch 300 g des oben erwähnten Futters. Am nächsten Tage erhielt das Tier 500 ccm in den Magen. Die ausgeschiedene Harnmenge betrug in der ersten Stunde 106 ccm, in der zweiten Stunde 223 ccm, in der dritten Stunde 86 ccm, in der vierten Stunde 46 ccm, insgesamt 460 ccm Harn mit einem spezifischen Gewicht von 1000 bis 1004. Wird gleichzeitig mit der Wasserzufuhr dem Tier ein wirksames Hypophysenpräparat injiziert, so läßt sich bei einer wirksamen Dosis die bekannte Hemmung der Diurese nachweisen. Eine Schwierigkeit bei Aufstellung derartiger Versuche ist durch die Tatsache bedingt, daß die verschiedenen Präparate des Handels eine verschiedene Wirksamkeit zeigen. Ja auch Präparate, die unter dem gleichen Namen in den Handel kommen, wirken verschieden. Wir verwendeten

[1]) Deutsch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 51.

Tabelle I.

Versuch Nr.	Datum 1925	Gewicht des Hundes kg	Futter am Tage vorher g	Zugeführtes Wasser ccm	Injizierte Menge	Harnmenge Std.	Harnmenge ccm	Spez. Gewicht
				Hund B.				
1	5. II.	13,5	700	500	0,8 ccm Pituglandol I	1.	22	1018
						2.	60	1001
						3.	32	1006
						4.	79	1000
					Insgesamt:		193	
2	16. II.	12,2	900	500	0,6 ccm Pituglandol I	1.	32	1008
						2.	60	1001
						3.	66	1000
						4.	14	—
					Insgesamt:		172	
3	19. II.	12,4	1000	500	0,6 ccm Pituglandol I	1.	66	1000
					1,6 „ Insulin *Kahlbaum*	2.	47	1004
						3.	116	1000
						4.	126	—
					Insgesamt:		355	
				Hund D.				
4	10. III.	8,8	800	500	0,98 ccm Pituglandol I	1.	14	—
						2.	20	—
						3.	66	1005
						4.	43	1000
						5.	20	1003
					Insgesamt:		163	
5	17. II.	9,0	800	500	0,9 ccm Pituglandol I	1.	14	—
						2.	12	—
						3.	27	1008
						4.	92	1000
					Insgesamt:		145	
6	12. III.	8,6	800	500	0,98 ccm Pituglandol I	1.	8	—
					1,6 „ Insulin *Kahlbaum*	2.	10	—
						3.	30	—
						4.	170	1000
						5.	65	1002
					Insgesamt:		283	
7	20. II.	8,9	800	500	0,9 ccm Pituglandol I	1.	30	1002
					1,8 „ Insulin *Kahlbaum*	2.	85	1002
						3.	126	1000
						4.	142	1000
					Insgesamt:		383	
				Hund E.				
8	18. II.	11,8	900	500	0,9 ccm Pituglandol I	1.	8	—
						2.	19	1006
						3.	50	1002
						4.	80	1000
					Insgesamt:		157	

Tabelle I (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1925	Gewicht des Hundes kg	Futter am Tage vorher g	Zugeführtes Wasser ccm	Injizierte Menge	Harnmenge Std.	Harnmenge ccm	Spez. Gewicht
					Hund E.			
9	21. II.	11,9	900	500	0,9 ccm Pituglandol I	1.	48	1004
					1,8 „ Insulin *Kahlbaum*	2.	50	1004
						3.	105	1000
						4.	120	1000
					Insgesamt:		323	
					Hund B.			
10	23. II.	12,0	900	500	0,9 ccm Pituglandol II	1.	50	1008
						2.	134	1000
						3.	90	1000
						4.	33	1001
					Insgesamt:		307	
11	2. III.	11,9	1000	500	1,92 ccm Pituglandol II	1.	20	1003
						2.	94	—
						3.	130	1001
						4.	110	1001
					Insgesamt:		354	
12	26. II.	12,1	900	500	0,9 ccm Pituglandol II	1.	44	1010
					1,6 „ Insulin *Kahlbaum*	2.	134	1000
						3.	156	1000
						4.	120	1001
					Insgesamt:		454	

Tabelle II.

Versuch Nr.	Datum 1925	Gewicht des Hundes kg	Futter am Tage vorher g	Zugeführtes Wasser ccm	Injizierte Menge	Harnmenge Std.	Harnmenge ccm	Spez. Gewicht
1	6. III.	12	1000	500	1,2 ccm Insulin *Kahlbaum*	1.	240	1000
						2.	164	1000
						3.	38	1000
						4.	18	—
					Insgesamt:		460	
2	22. IV.	11,6	1100	500	1,6 ccm Insulin *Merck* (Nr. 3. 2571)	1.	154	1000
						2.	146	—
						3.	20	—
						4.	40	1001
					Insgesamt:		360	
3	23. IV.	11,5	1000	500	1,2 ccm Insulin *Kahlbaum*	1.	134	—
						2.	234	1002
						3.	64	1000
						4.	34	1004
					Insgesamt:		466	

Tabelle II (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Datum 1925	Gewicht des Hundes kg	Futter am Tage vorher g	Zugeführtes Wasser ccm	Injizierte Menge	Harnmenge		Spez. Gewicht
						Std.	ccm	
				Hund E.				
4	9. II.	12,2	1000	500	1,6 ccm Insulin *Kahlbaum*	1.	166	—
						2.	126	—
						3.	62	1000
						4.	36	1003
						5.	60	1003
					Insgesamt:		450	
5	18. III.	12,0	1000	500	1,1 ccm Insulin *Kahlbaum*	1.	80	1002
						2.	260	1000
						3.	50	1004
						4.	30	1001
					Insgesamt:		420	
6	17. IV.	11,2	1000	500	2,8 ccm Insulin *Merck* (Nr. 3 24. 1254)	1.	82	1001
						2.	166	1000
						3.	43	1004
						4.	50	1002
					Insgesamt:		341	
				(Krämpfe, tot.)				

zwei Pituglandolpräparate, die wir als I und II bezeichnen. Beim Vergleich der Versuche 2 und 11 (Tabelle I) fällt auf, daß Pituglandol I bei einer Dosis von 0,6 ccm eine deutliche Hemmung der Diurese (innerhalb 4 Stunden 172 ccm Harn) hervorruft, während Pituglandol II bei der dreifachen Dosis nur eine ganz schwache Wirkung zeigt. Die gleichen Erfahrungen machten wir mit zwei Hypophenpräparaten[1]). Dazu kommt die verschiedene Empfindlichkeit der Versuchstiere, die sicher vorhanden ist, so daß die Beurteilung der Versuchsergebnisse nicht ganz leicht ist. Trotzdem zeigen die Versuche, die wir in der Tabelle I zusammengestellt haben, daß bei gleichzeitiger Applikation von Hypophenpräparat und Insulin die Diuresehemmung geringer ist, als in den Kontrollversuchen. Vergleiche die Versuche 3, 7 und 9. Es sei bemerkt, daß wir das Insulin 1 Stunde vor der Hypophysenapplikation subkutan injiziert haben.

Insulin allein beeinflußt die Diurese nicht, wie aus der Tabelle II hervorgeht.

Zusammenfassung.

1. Die Hypophysenpräparate zeigen in bezug auf die diurese hemmende Wirkung eine verschiedene Wirksamkeit.

2. Die diuresehemmende Wirkung der Hypophysenpräparate läßt sich durch Insulin antagonistisch beeinflussen.

3. Insulin allein beeinflußt die Diurese nicht.

---

[1]) Den Chemischen Werken Grenzach A.-G. in Baden und der Firma Gehe & Co. danken wir bestens für die freundliche Überlassung ihrer Präparate.

Über das physiologische Verhalten des Acetoins.

I. Mitteilung: Über das Verhalten des Acetoins zu Hefe.

Von

C. Neuberg und M. Kobel.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Im Verlaufe der Untersuchungen über die phytochemische Reduktion haben *C. Neuberg* und *F. F. Nord*[1]) festgestellt, daß das einfachste Diketon der aliphatischen Reihe, das Diacetyl, $CH_3 . CO . CO . CH_3$, von gärender Hefe zu β, γ-Butylenglykol, $CH_3 . CHOH . CHOH . CH_3$, reduziert wird. Sie haben darauf hingewiesen, daß der Weg vom Diketon zum Glykol wahrscheinlich über die Stufe der halbseitig hydrierten Verbindung, d. h. über das Acetyl-methyl-carbinol, $CH_3 . CO . CHOH . CH_3$, führt. Zu dieser Annahme lag um so größere Berechtigung vor, als bei entsprechender biochemischer Behandlung des einfachsten aromatischen Diketons, des Benzils, $C_6H_5 . CO . CO . C_6H_5$, die Reaktion vornehmlich beim Benzoin, $C_6H_5 . CO . CHOH . C_6H_5$, stehen bleibt.

Inzwischen hat das Acetyl-methyl-carbinol eine besondere Bedeutung dadurch erlangt, daß es bei der Vergärung von Zucker mittels Hefe zum erstenmal als ein Produkt ihres Kohlenhydratstoffwechsels nachgewiesen worden ist [*C. Neuberg* und *E. Reinfurth*[2])]. Die Acetoinsynthese ist als ein Sonderfall der Acyloinbildung aufzufassen, die nach den Untersuchungen von *C. Neuberg* mit *J. Hirsch* und *L. Liebermann*[3]) eine allgemeinere Leistung der Hefezelle ist und auf die Äußerung eines besonderen Fermentes, der Carboligase, zurückgeführt werden kann. Aldehyde, wie Benzaldehyd und seine Substitutionsprodukte, erfahren außer der eigentlichen phytochemischen Reduktion zu den zugehörigen Alkoholen einen acyloinmäßigen Zusammenschluß mit naszierendem Acetaldehyd. Dieser selbst kann bei phytochemischen Reduktionen, den Übergängen von labilem Gärungswasserstoff auf fremde Acceptoren, oftmals als Oxydations-

---

1) *C. Neuberg* und *F. F. Nord*, B. **52**, 2248, 1919.

2) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **143**, 553, 1923.

3) *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, ebendaselbst **115**, 282, 1921; *C. Neuberg* und *L. Liebermann*, ebendaselbst **121**, 311, 1921.

äquivalent nachgewiesen werden[1]; denn es handelt sich ja im Grunde um nichts anderes, als um einen „Wettbewerb zwischen dem intermediär gebildeten Acetaldehyd und dem zugefügten Keton (Aldehyd) um den Wasserstoff, der beim ungestörten Gärakt in der letzten Phase die regelrechte Hydrierung zum Äthylalkohol besorgt".

Schon bei der Auffindung der Carboligase hatte sich gezeigt[2], daß ganz im Einklange mit der Brenztraubensäure-Acetaldehyd-Theorie der Gärung auch anderen Quellen als Zucker, beispielsweise der Brenztraubensäure entstammender Acetaldehyd zur Acyloinsynthese biochemisch verwendet werden kann. Eine weitere Entwicklung erfuhr die Erkenntnis dieser merkwürdigen Zusammenhänge durch die Beobachtung, daß Vergärung von Brenztraubensäure für sich Acetoin ergeben kann[3], wenn carboxylatisch bereits abgespaltener Acetaldehyd mit aus Brenztraubensäure gerade entstehendem Acetaldehyd zusammentritt[3]. Nimmt man dem Acetaldehyd, der durch die Brenztraubensäurevergärung geliefert wird, seine Bewegungsfreiheit, indem man ihn an schwefligsaures Salz bindet (nach Art der Vorgänge bei der zweiten Vergärungsform), so unterbleibt nach den Befunden von *C. Neuberg* und *A. von May*[4] die Acetoin-synthese, und man gelangt zur reinen carboxylatischen Spaltung der α-Ketosäure. Ganz ebenso wie bei der Brenztraubensäure liegen die Verhältnisse bei der Oxalessigsäure; nach den Feststellungen von *C. Neuberg* und *G. Gorr*[5] liefert die Vergärung dieser Substanz außer Acetaldehyd auch Acetoin und durch dessen sekundäre Reduktion β, γ-Butylenglykol. Die Richtigkeit der schon vor Jahren[6] geäußerten Gedankengänge über die Entstehungsweise des Acetoins (und Butylenglykols), die ja als Produkte des Bakterienstoffwechsels bekannt waren, erfährt eine Bestätigung durch die Versuche von *Neuberg* und *Reinfurth* (l. c.). Die Genannten zeigten, daß Acetaldehyd, zu einer gärenden Zuckerlösung gefügt, bis zu 100 Proz. seines Gewichts in Acetyl-methyl-carbinol, und zwar in die optisch-aktive Modifikation, übergeführt wird. Man hat also hier den bemerkenswerten Fall, daß ein Zerfallsprodukt des Zuckers, der Acetaldehyd, mit einem zweiten Acetaldehydmolekül auf biochemischem Wege kernsynthetisch verknüpft wird. Es erscheint von grundsätzlicher Bedeutung, daß damit zum ersten Male aus einem Stoff, wie ihn die Zucker-

---

[1] Diese Zeitschr. **91**, 260, 1918; **96**, 189, 1919; Ber. **52**, 2242 und 2251 1919.

[2] *C. Neuberg* und *J. Hirsch*, l. c.

[3] *J. Hirsch*, diese Zeitschr. **131**, 178, 1922.

[4] *C. Neuberg* und *A. v. May*, ebendaselbst **140**, 299, 1923.

[5] *C. Neuberg* und *G. Gorr*, ebendaselbst **154**, 495, 1924; Festschrift für *L. Asher* (Ergebnisse der Physiologie, Band **24**), 1925.

[6] *C. Neuberg* in Oppenheimers Handb. d. Biochem., 1. Aufl., **1**, 225, 1908; Monogr. Jena **1913**, S. 40; siehe auch diese Zeitschr. **115**, 288, 1921.

vergärung hervorbringt, nämlich aus Acetaldehyd, ein bis dahin nicht bei der Hefengärung beobachtetes Umsetzungsprodukt, das Acetoin, in so beträchtlicher Ausbeute gewonnen wurde, daß sie, wie erwähnt, der Quantität des vorhandenen Acetaldehyds entsprach. Damit war, da die Carboligase auch losgelöst von der lebenden Hefezelle ihre Wirksamkeit entfaltet, zum ersten Male eine Umkehr enzymatischer Spaltungsvorgänge bei der alkoholischen Gärung nachgewiesen.

Ähnlich wie es bei Vorhandensein von Acetaldehyd in einer zuckerhaltigen Flüssigkeit zum Aufbau von Acetoin durch die Hefe kommt, kann man auch durch Zugabe von Acetaldehyd zu einer gärenden Brenztraubensäurelösung eine verstärkte Acetoinsynthese veranlassen. Hierbei handelt es sich, wie *C. Neuberg* und *O. Rosenthal*[1]) dargelegt haben, gleichfalls um die gesteigerte Umdrehung von Abbau in die Richtung des Aufbaues einer mehrgliedrigen Kohlenstoffkette. Die Reaktion läuft zugleich darauf hinaus, daß „Acetaldehyd durch Acetaldehyd abgefangen" wird. Es kommt zum paarigen Aufbau, der sein physiologisches Gegenstück in dem bekannten paarigen Abbau besitzt. Da es nach dem Gesagten gleichgültig ist, welche Herkunft der Acetaldehyd bei der Acetoinsynthese besitzt, d. h. ob er durch eine Wirkung der Hefe selbst entsteht (z. B. aus Brenztraubensäure oder Oxalessigsäure), oder ob er in fertiger Gestalt zu gärender Brenztraubensäure oder zu gärender Zuckerlösung zugegeben wird, so konnten jüngst *C. Neuberg* und *E. Simon*[2]) betonen, daß es sich gewissermaßen bei der Acetoin-Synthese um einen unvollkommenen Versuch zur Rekonstruktion von Kohlenhydrat handelt. Die Ähnlichkeit des Acetoins mit den Zuckerarten ist weitgehend, und auch formal besteht eine Analogie zu den Ergebnissen von *O. Meyerhof*[3]) über die physiologische Restitution von Milchsäure zu Kohlenhydrat insofern, als ein bereits auf der Bahn des Abbaus gelegenes Umwandlungsprodukt durch die Zersetzung eines bestimmten Kohlenhydrat-anteils oder -äquivalents die rückläufige Umwandlung erfährt. In diesem Sinne kann die carboligatische Synthese als einfachster Fall der gekoppelten Resynthese gelten.

In Anbetracht der Bedeutung, die somit dem Acetoin beigelegt werden darf, haben wir die schon früher angekündigten physiologischen Untersuchungen dieses Körpers in Angriff genommen und berichten im folgenden zunächst über das Verhalten des Acetoins zu dem Organismus, von dem es auf den erwähnten Wegen erzeugt wird.

Weil das Acetoin formelgemäß aus den in biologischer Hinsicht so labilen Acetaldehyd-komponenten zusammengefügt ist, so mußte man

---

[1]) *C. Neuberg* und *O. Rosenthal*, Ber. **57**, 1436, 1924.

[2]) *C. Neuberg* und *E. Simon*, diese Zeitschr. **156**, 378, 1925; vgl. auch *C. Neuberg*, „Die deutsche Zuckerindustrie" **1924**, Nr. 36.

[3]) *O. Meyerhof* und *R. Meyer*, Pflüg. Arch. **204**, 448, 1924.

in Betracht ziehen, daß unter Umständen auch eine Aufspaltung des Acetoins, also eine Umkehr der Carboligasewirkung, erfolgen würde. Wir prüften deshalb, wie das Schicksal des Acetoins in Berührung mit lebhaft arbeitender Hefe ist.

Zu den Versuchen diente synthetisches, also racemisches Acetyl-methyl-carbinol, das wir nach der Vorschrift von *O. Diels* und *E. Stephan*[1]) durch Reduktion von Diacetyl bereitet haben. Es ergab sich, daß Acetoin bei der Zumischung zu einer gärenden Zuckerlösung der phytochemischen Reduktion anheimfällt. Wie in allen Fällen, die dazu Veranlassung bieten können, vollzieht sich dieselbe asymmetrisch; dabei wird, abweichend von dem bekannten Mechanismus der *Pasteur*schen Methode, nicht ein Antipode durch die *Oxydation* fortgeschafft, sondern durch *Hydrierung* hervorgebracht. In einer Ausbeute von 60 Proz. haben wir lävogyres β, γ-Butylenglykol isoliert; die Drehung war mehr als doppelt so groß, als sie früher *Neuberg* und *Nord* (l. c.) an dem phytochemisch aus Diacetyl erzeugten Glykol beobachtet hatten. In Ansehung der befolgten Isolierungsmethode darf die wahre Ausbeute an dem mehrwertigen Alkohol höher veranschlagt werden; jedenfalls hat sich kein Anzeichen dafür ergeben, daß die Hefe unter den innegehaltenen Bedingungen ihr carboligatisches Erzeugnis wieder in größerem Umfange zerlegt.

Bezüglich der Gewinnung des β, γ-Butylenglykols aus den Gäransätzen bedienten wir uns des von *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*[2]) beschriebenen Verfahrens zur analogen Abtrennung von Glycerin. Das β, γ-Butylenglykol wurde in Substanz abgeschieden und noch durch das Di-Phenylurethan sowie durch Rückverwandlung in Acetyl-methyl-carbinol bzw. Diacetyl identifiziert.

200 g Rohrzucker wurden in 2 Litern Wasser von 40° gelöst und mit 200 g Unterhefe zur Angärung gebracht; dann wurden 10 g Acetoin in kleinen Portionen hinzugefügt. Die Kohlensäureentwicklung wurde dadurch nicht gehemmt. Nachdem das Gemisch einen Tag bei Zimmertemperatur gestanden hatte, wurden 100 g Hefe hinzugegeben und die Gärung im Brutschrank bei 32° fortgesetzt. Am dritten Tage reduzierte eine Probe der verdünnten Lösung *Fehling*sche Mischung nicht mehr. Es wurden aber trotzdem weitere 100 g Hefe hinzugesetzt und das Gemisch noch einen Tag im Brutschrank aufbewahrt. Am vierten Tage wurde filtriert. Aus der Lösung wurde das β, γ-Butylenglykol durch Extraktion mit Alkohol-Äther isoliert. Das filtrierte Gärgut wurde zunächst im *Faust-Heim*schen Apparat bei 30 bis 35° zum Sirup eingeengt und dieser mit 96proz. Alkohol so lange durchgeknetet, bis der Rückstand bröckelig wurde. Der filtrierte alkoholische Auszug wurde im Vakuum bei 30° zum Sirup eingedampft und mit absolutem Alkohol aufgenommen. Die sich abscheidenden Stoffe wurden in der Kälte abfiltriert und gut ausgewaschen. Der Alkohol wurde im

---

[1]) *O. Diels* und *E. Stephan*, B. **40**, 4336, 1907.

[2]) *C. Neuberg* und *E. Reinfurth*, diese Zeitschr. **92**, 234, 1918.

Vakuum wieder verdampft, der Rückstand nochmals in absolutem Alkohol gelöst und die Operation so lange wiederholt, bis klare Auflösung in absolutem Alkohol eintrat. Dann wurde zu der alkoholischen Lösung das gleiche Volumen trockenen Äthers gefügt, filtriert und wieder eingeengt; nunmehr löste sich der Rückstand in einem Gemisch von gleichen Teilen absoluten Alkohols und absoluten Äthers vollkommen auf. Die alkoholisch-ätherische Lösung wurde über frisch geglühtem Natriumsulfat getrocknet und das Solvens am Birektifikator abgetrieben. Der dickflüssige Rückstand wurde mit wenig absolutem Alkohol in ein Fraktionierkölbchen übergeführt und im Vakuum bei 12 mm destilliert. Nach einem hauptsächlich Äthylalkohol enthaltenden Vorlauf wurde die Fraktion von 85 bis 91° gesondert aufgefangen und die Destillation darauf abgebrochen, da der Rückstand sich unter Bildung brenzlicher Dämpfe zersetzte. Die Fraktion von 85 bis 91° (12 mm) wurde unter Atmosphärendruck rektifiziert; zwischen 178 bis 181° wurden 5,8 g reines β, γ-Butylenglykol aufgefangen.

Bei einem zweiten Ansatz wurden 30 g Acetoin mit den entsprechenden Mengen Zuckerlösung und Hefe behandelt. Die Aufarbeitung war dieselbe wie bei dem ersten Ansatz. Ausbeute 17,6 g Butylenglykol vom Siedepunkt 178 bis 181°.

Das Butylenglykol dieser Fertigung wies eine Linksdrehung von — 5,51° im 1-dcm-Rohr auf. Es reduzierte *Fehling*sche Lösung nicht im geringsten und zeigte das typische Verhalten der Glykole, Kupferhydroxyd nach Zugabe von Natronlauge aufzulösen.

Zur Identifizierung wurde das Di-Phenylurethan dargestellt, das von *A. Harden* und *G. S. Walpole*[1]) beschrieben worden ist.

Aus 1 g Butylenglykol und 5 g Phenylisocyanat bildete sich in ätherischer Lösung nach kurzem Erwärmen auf dem Wasserbade und eintägigem Stehen ein Gemisch von Mono- und Di-Phenylurethan. Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Alkohol erhält man letzteres, das schwerer löslich ist, in reinem Zustande. Als Schmelzpunkt der Verbindung $CH_3.CH(O.CO.NHC_6H_5).CH(O.CO.NHC_6H_5).CH_3$ fanden wir 201° (unkorr.).

0,1406 g Substanz: 10,6 ccm N_2 (19,5°, 752,5 mm, 33 Proz. KOH)

$C_{18}H_{20}N_2O_4$: Ber.: N = 8,53 Proz.;
gef.: N = 8,59 Proz.

In ähnlicher Weise wie *Neuberg* und *Gorr* (l. c.) haben wir das Butylenglykol durch Rückoxydation zum Acetoin noch besonders charakterisiert. Die Umwandlung ließ sich leicht mit Natriumhypobromit bewerkstelligen. Brom greift das Butylenglykol in Sodalösung schnell an, während Bromwasser allein nach *H. von Pechmann*[2]) sowie *A. Harden* und *G. S. Walpole*[1]) nur im Sonnenlicht und langsam einwirkt.

1 g β, γ-Butylenglykol wurde zusammen mit 3,5 g Kristallsoda in 6 ccm warmem Wasser gelöst. Nach Abkühlung in Eis wurden 0,5 ccm Brom hinzugefügt. Beim Umschütteln löste sich letzteres rasch unter Kohlendioxydentwicklung auf. Nach halbstündigem Stehen wurde gemäß der Vorschrift von *E. Fischer* und *J. Tafel*[3]) genau mit Salzsäure neutralisiert. Das Brom war nahezu vollkommen verbraucht, die schwach gelbe Lösung wurde beim

---

[1]) *A. Harden* und *G. S. Walpole*, Proc. Roy. Soc. B. **77**, 399, 1906.
[2]) *H. v. Pechmann*, B. **23**, 2427, 1890.
[3]) *E. Fischer* und *J. Tafel*, B. **20**, 3385, 1887.

Einleiten weniger Blasen von schwefliger Säure gänzlich entfärbt. Das Oxydationsgemisch reduzierte *Fehling*sche Flüssigkeit intensiv schon in der Kälte, wobei sich rotes Kupferoxydul abschied. Die mit Calciumcarbonat genau neutralisierte Flüssigkeit lieferte mit Nitroprussidnatrium und Piperidin eine rötlich-blaue Färbung, die auf Zugabe von Essigsäure in Blaugrün umschlug. Bei Behandlung mit einer essigsauer-alkoholischen Lösung von p-Nitrophenyl-hydrazin (3 g) erhielten wir nach zweistündigem Erwärmen auf dem Wasserbade 1,5 g des charakteristischen Acetoin-p-nitrophenylosazons, das durch Umkristallisieren aus Pyridin-Eisessig in leuchtend roten Kristallen vom Schmelzpunkt 326° (bei schnellem Erhitzen, nach vorheriger Sinterung bei 316°) rein gewonnen wurde.

0,1685 g Substanz: 34,4 ccm N_2 (19°, 756 mm, 33 Proz. KOH).

$C_{16}H_{16}N_6O_4$: Ber. N = 23,59 Proz.;
gef. N = 23,43 „ .

Bemerkt sei übrigens, daß während der Oxydation mit Hypobromit auch der charakteristische Geruch nach Diacetyl auftrat.

Über den Nachweis von Acetaldehyd als Zwischenstufe bei der anaeroben Atmung höherer Pflanzen.

Von

C. Neuberg und A. Gottschalk.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Am Prozeß der alkoholischen Zuckerspaltung durch Hefe ist mit Hilfe der Abfangverfahren zuerst die Feststellung gemacht worden, daß der für gewöhnlich nicht zutage tretende Acetaldehyd ein unumgängliches Durchgangsglied des Kohlenhydratabbaues bildet. Aus diesem von *C. Neuberg*, *E. Färber* und *E. Reinfurth* (1916 bis 1918) erbrachten Beweis ergibt sich die Berechtigung für die Lehre, daß auch bei ausgeglichenen anoxybiotischen Vorgängen, die an sich mit keiner merklichen Sauerstoffzehrung einhergehen, Oxydationen und Reduktionen der intermediären Spaltungsprodukte nebeneinander ablaufen.

Beim Hefepilz ist die Entstehung von Acetaldehyd nicht an die Zufuhr von Sauerstoff geknüpft; und doch stellt dabei der Acetaldehyd eine unzweifelhafte Oxydationsstufe dar, nicht nur im Vergleich zu dem normalen Gärungsenderzeugnis Äthylalkohol, sondern auch in bezug auf den Zucker. Denn die Erhebung von $\frac{1}{2}C_6H_{12}O_6$ auf die Stufe der Brenztraubensäure, $C_3H_4O_3$, bedeutet eine Oxydation, und daran ändert die Decarboxylierung, die den Acetaldehyd liefert, ebensowenig wie die Tatsache, daß infolge Vorliegens eines äußerlich kompensierten Systems von gekoppelten Dehydrierungen und Hydrierungen (Dismutationen) die Oxydationsstufen auch in Abwesenheit von Sauerstoff gebildet werden und wieder verschwinden, wenn sie nicht durch besondere Maßnahmen festgelegt werden.

Der Befund des Vorkommens von Acetaldehyd als zwangsläufiger Abbaustufe im intermediären Kohlenhydratumsatz ist nicht auf die Hefezelle beschränkt. Bei zahlreichen anderen Gärungserscheinungen[1], wie sie von mannigfachen Pilzen und Bakterien ausgelöst werden, glückte der gleiche Nachweis, so bei der Zerlegung der verschiedenen Zucker und verwandten Substanzen durch Mucoraceen, Endomyces, Monilien, Oidien, Aspergillusarten, Penicillien, Merulius, Kahmhefen, durch Bakterien der Coli- sowie der Lactis aerogenes-Gruppe, durch Ruhrerreger, Buttersäurebazillen und dergleichen; ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Cellulosegärung.

---

[1]) Vgl. hierzu die zusammenfassenden Darstellungen von *C. Neuberg* in den Ber. **55**, 3624, 1922 sowie in Oppenheimers Handb. d. Biochemie, Bd. **II**, 442, 1924.

Viel weniger gut sind wir über den Mechanismus der anaeroben Atmung in höheren Pflanzen orientiert.

W. Zaleski und *E. Marx*[1]) haben mitgeteilt, daß der gepulverte Samen von Lupinen kleine Mengen von Acetaldehyd entwickelt, namentlich aber Brenztraubensäure in Acetaldehyd und Kohlendioxyd spaltet (Carboxylasewirkung). Von *S. Kostytschew, E. Hübbenet* und *A. Scheloumoff*[2]) stammt die Angabe, daß Pappelblüten im Wasserstoffstrome Acetaldehyd bilden; dabei ist allerdings der Nachweis nicht erbracht, daß dieser Acetaldehyd die Vorstufe des bei der intramolekularen Atmung auftretenden Äthylalkohols ist.

Um einen genaueren Einblick in den Chemismus der *unter Luftabschluß erfolgenden Bildung von Acetaldehyd und Weingeist durch keimende Pflanzensamen* zu gewinnen, stellten wir folgende Versuchsreihen an:

Anordnung.

150 g Erfurter Zuckererbsen (Samen) bzw. Puffbohnen (Samen) wurden 40 Minuten lang in eine 0,1 proz. Sublimatlösung gelegt. Daraufhin wurden die Samen auf eine sterilisierte Nutsche gebracht, viermal je 5 Minuten lang mit reichlichen Mengen sterilen Wassers gewaschen und zur Auskeimung in eine große sterile Petrischale geschüttet, die zur Hälfte mit ausgekochtem Leitungswasser angefüllt war. Dieses Wasser wurde alle 36 Stunden erneuert. Nach drei- bis fünftägiger Keimung (zu dieser Zeit waren die Wurzelspitzen bei Zimmertemperatur etwa 3 mm lang geworden) wurde das Material in einer sterilen Reibschale unter aseptischen Vorsichtsmaßregeln grob[3]) zerkleinert und alsdann in eine keimfreie Glasflasche übergeführt.

Bei den Versuchen, die im folgenden beschrieben sind, wurden einige auch unter Anwendung von Toluol vorgenommen.

I. Ansatz.

150 g Erbsensamen (bzw. Puffbohnensamen) wurden in 750 ccm einer 1,33 proz. sterilisierten Traubenzuckerlösung aufgeschwemmt.

II. Ansatz.

Im Abfangversuch wurde der Brei von 150 g ebenso vorbehandeltem Samen gleichfalls in 750 ccm einer 1,33 proz. Glucoselösung suspendiert, jedoch unter Zugabe von 10 g frisch bereiteten Calciumsulfits.

Durch beide Behälter (*a*) wurde ein konstanter Strom von Wasserstoffgas aus *Kipp*schen Apparaten geleitet, das zwecks Reinigung bzw. zur

[1]) *W. Zaleski* und *E. Marx*, diese Zeitschr. **47**, 184, 1912; **48**, 175, 1913; *W. Zaleski*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **31**, 349, 1913, **32**, 87 u. 457, 1914.

[2]) *S. Kostytschew, E. Hübbenet* und *A. Scheloumoff*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **83**, 105, 1913.

[3]) Nach *E. Godlewski* und *F. Polzeniusz* (Apoth.-Ztg. **12**, 717, 1897; Anz. d. Akad. d. Wissensch., Krakau **1901**, S. 227) ist die Atmung an die Zellstruktur gebunden; deshalb nahmen wir von zu weit gehender Zertrümmerung Abstand.

Entfernung von beigemengtem Sauerstoff vorher Waschflaschen mit Kaliumpermanganatlösung und solche mit einer alkalischen Auflösung von Pyrogallussäure (5 g Pyrogallussäure in 15 ccm Wasser + 120 g KOH in 80 ccm Wasser) durchperlte und zur letzten Befreiung von etwaigen Mikroorganismen und mitgerissenen Tröpfchen durch ein mit steriler Watte ausgefülltes U-förmiges Schutzrohr geführt wurde. Als Vorlage (*b*) diente je ein Gefäß, das 150 ccm einer 10proz. Kaliumbisulfitlösung enthielt. Nach 68 bis 72 Stunden wurden die Versuche abgebrochen und die beiden zusammengehörigen Ansätze in der nachfolgend beschriebenen Weise aufgearbeitet:

Zunächst wurde der Inhalt des Behälters *b* durch Schütteln mit kohlensaurem Kalk neutralisiert. Außerdem wurden zu *b* noch 50 g Calciumchlorid (in wenig Wasser) gegeben, um gelöstes Sulfit[1]) auszufällen. Alsdann wurde der Inhalt der beiden Gefäße *a* und *b* vereinigt; nach Zusatz von überschüssigem Calciumcarbonat wurden am absteigenden Kühlersystem 500 ccm Flüssigkeit durch Dampfdestillation in eine eisgekühlte Vorlage übergetrieben:

α) 250 ccm des Destillats wurden auf dem Drahtnetz vorerst über 0,3 g Bleicarbonat, dann über 5 Tropfen verdünnter Schwefelsäure anreichernd redestilliert und schließlich 25 ccm Flüssigkeit aufgefangen. Dieses Enddestillat diente zur quantitativen Bestimmung des Acetaldehyds, und zwar wurde in den Kontrollansätzen, wo es sich um ganz geringfügige Mengen handelte, das von *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*[2]) näher beschriebene Hydroxylamin-sulfat-Verfahren angewendet, in den Abfangversuchen hingegen die *Ripper*sche Methode.

β) In der anderen Hälfte des ursprünglichen Destillats wurde zuerst durch Silberoxyd der Acetaldehyd zerstört; alsdann wurde die Flüssigkeit durch mehrmalige Rektifikation in der Weise eingeengt, daß stets zwei Drittel des Kolbeninhalts übergetrieben wurden. Enddestillat auf 25 ccm. Nachdem wir uns durch die Nitroprussidnatrium-Reaktion von der Aldehydfreiheit des Destillats überzeugt hatten, ermittelten wir den Äthylalkohol auf pyknometrische Weise.

Die zahlenmäßigen Ergebnisse unserer Versuche sind in der Tabelle vereinigt. Sie bestätigen zugleich die Feststellung der älteren und neueren Autoren: *Pasteur*, *Lechartier* und *Bellamy*, *Brefeld*, *Matrouchot* und *Molliard*, *Mazé*, *Godlewski* und *Polzeniusz*, *Palladin* und *Kostytschew*, *Lüers* und *Schmal*, daß *Pflanzensamen* unter Sauerstoffabschluß erhebliche Mengen von Äthylalkohol bilden. Acetaldehyd konnte in den Normalversuchen nur in Spuren nachgewiesen werden.

---

[1]) Dieses entsteht gemäß der Gleichung: $2\,KHSO_3 + CaCO_3 = CaSO_3 + H_2O + CO_2 + K_2SO_3$.

[2]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **146**, 164. 1924.

Art und Menge des Materials	Im 3-Tageversuch unter O_2-Abschluß wurden gebildet im			
	Normalversuch		Abfangversuch	
	Acetaldehyd mg	Alkohol g	Acetaldehyd mg	Alkohol g
150 g Erbsensamen in 750 ccm	5,5	3,00	164,2	0,33
150 g Erbsensamen in 750 ccm	3,8	2,50	203,0	0,25
150 g Puffbohnen in 750 ccm	12,0	1,80	135,0	0,40
150 g Puffbohnen in 750 ccm	11,8	2,00	186,6	0,30
100 g Erbsensamen in 500 ccm + 5 ccm Toluol . .	6,5	—	138,6	—

Wird hingegen Calciumsulfit als Abfangsmittel hinzugefügt, so kommt es zur *Fesselung beträchtlicher Mengen von Acetaldehyd; die Zunahme steigt bis auf das 50 fache des Aldehydwertes in den Normalversuchen, d. h. den zusatzfreien Kontrollen. Gleichzeitig sinkt die Quantität des erzeugten Weingeistes.* Wenn in unseren Experimenten das Alkoholdefizit im Abfangversuch nur zum Teil durch den festgelegten Acetaldehyd gedeckt wird, so ist das hauptsächlich auf eine allgemeine Depression der Fermentprozesse unter dem Einfluß des für die Zelle nicht ganz gleichgültigen Sulfits zurückzuführen. Um so höher ist die erhebliche Vermehrung der Aldehydausbeuten unter diesen Bedingungen zu bewerten.

Obige Versuche tun dar, daß auch bei der intramolekularen Atmung höherer Pflanzenzellen der Weg zum Äthylalkohol über das Glied des Acetaldehyds führt. Durch diesen Einblick in den intermediären Chemismus der Weingeistproduktion bei höheren Pflanzenzellen ist ein neuer Beweis für die nahe Verwandtschaft von alkoholischer Gärung der Mikroorganismen und anaerober Atmung höher organisierter Vegetabilien erbracht.

Daß bei diesen zymaseartige Fermente vorkommen, ist seit längerer Zeit bekannt. Bald nach Entdeckung der Hefenzymase hat *J. Stoklasa*[1]) angegeben, daß aus Samenpflanzen (Zuckerrübenwurzeln) Präparate darstellbar sind, die Glucose in Äthylalkohol und Kohlensäure zerlegen. Diese Behauptung wurde zunächst angezweifelt, da man anwesende Bakterien für die Gärung verantwortlich machte; späterhin haben *W. Palladin* und *S. Kostytschew* sowie namentlich *J. Bodnár*[2]) Alkoholbildung in verschiedenen Pflanzen unter Ausschluß von niederen Organismen außer Zweifel gestellt. Die Wirkungsweise der in Samenpflanzen tätigen Zymase

[1]) *J. Stoklasa*, *J. Jelinek* und *E. Vitek*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**, 460, 1903.

[2]) *W. Palladin* und *S. Kostytschew*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**, 214, 1906; *J. Bodnár*, diese Zeitschr. **73**, 193, 1916.

ist derjenigen des zuckervergärenden Hefeferments entsprechend[1]). In beiden Fällen übt Sauerstoff auf den Vorgang der Alkoholbildung keinen wesentlichen Einfluß aus.

In jenen Pflanzenzellen, die schon unter normalen Verhältnissen unter partiellem Sauerstoffmangel leiden dürften, so z. B. in Pflanzensamen auf bestimmten Keimungsstadien, in fleischigen Früchten zur Zeit der Reifung, sind neben Alkohol stets geringe Mengen von Acetaldehyd anzutreffen. So wurde von *P. Mazé*[2]) ein spärliches Vorkommen von Acetaldehyd u. a. in Maissamen, von *H. Müller-Thurgau* und *A. Osterwalder*[3]) in Äpfeln und Birnen beobachtet. Auch wir haben in *Bananen*, die in frischem Zustande der Destillation unterworfen wurden, deutlich nachweisbare Quantitäten von Acetaldehyd gefunden. Ob es sich in diesen Fällen jedoch um primären, auf spezifische Weise gebildeten Acetaldehyd handelt, oder um solchen, der seine Entstehung einer Reoxydation des Alkohols verdankt, ist aus Versuchen ohne Abfangmittel nicht erkennbar. In jüngster Zeit hat, in bestem Einklang mit unseren bereits vor Jahresfrist im Auszug[4]) mitgeteilten Versuchsergebnissen, *G. Klein*[5]) Acetaldehyd auch bei der normalen Atmung grüner Pflanzen (Knospen, Blüten und Keimlingsgewebe) mit dem Dimedon-Abfangverfahren festlegen können, allerdings, wie es scheint, in sehr kleiner Menge. Nehmen wir den weiteren von *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*[6]) erhobenen Befund hinzu, daß auch in animalischen Zellen, z. B. der quergestreiften Muskulatur von Kaltblütern, die sich am Kohlenhydratmolekül abspielenden Oxydationsprozesse zum mindesten in einem Ausmaß von 37 bis 45 Proz. der Theorie den Weg über Acetaldehyd gehen, so erscheint die Annahme berechtigt, daß die Atmung, gleichgültig ob vorwiegend oxydativ oder oxydo-reduktiv (anaerob), sowohl im Pflanzenreich als in der Tierwelt durch die obligate Bildung von Acetaldehyd gekennzeichnet ist.

---

[1]) Es sei aber nicht verschwiegen, daß die anaerobe Atmung derjenigen Vegetabilien und Pflanzenteile, die bei Sauerstoffzutritt eine stark oxydierende Tätigkeit entfalten, nicht immer mit der alkoholischen Gärung identisch ist. So hat schon vor längerer Zeit *M. Hahn* (Ber. **33**, 3555, 1900) gezeigt, daß die anaerobe Zuckerzerstörung durch den Preßsaft der Blütenstände von Arum maculatum ohne Alkoholbildung verläuft, und das gleiche hat *S. Kostytschew* (Ber. d. bot. Ges. **25**, 188, 1907) für den Fruchtkörper von Champignons angegeben.

[2]) *P. Mazé*, C. r. **151**, 1383, 1910.

[3]) *H. Müller-Thurgau* und *A. Osterwalder*, Landw. Jahrb. der Schweiz **1915**, 404.

[4]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **151**, 167, 1924.

[5]) *G. Klein*, Naturw. **13**, 21, 1925.

[6]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **158**, 253, 1925.

Über die Rolle der Begleitstoffe bei der Immunisierung mit Invertasepräparaten.

Von

A. Bach, W. Engelhardt und A. Samysslov.

(Aus dem Biochemischen Institut des Kommissariats für Volksgesundheit und der Biochemischen Abteilung des Instituts für experim. Veterinärie in Moskau.)

(Eingegangen am 8. Mai 1925.)

I.

Von *Bach* und *Engelhardt* (1) wurde die Ansicht ausgesprochen, daß die Spezifität der antiphenolatischen Immunsera durch die Anwesenheit von bestimmten, als eigentliche Antigene fungierenden Begleitstoffen bedingt sei. Das Ferment werde beim Zusammentreffen mit dem Immunserum nur sekundär mitgerissen und inaktiviert. In vorliegender Arbeit suchten wir dieser Frage näher zu kommen, indem wir die antigenen Eigenschaften eines Enzyms untersuchten, welches leicht in verschiedenen Reinheitsgraden gewonnen werden konnte. Trifft die obige Annahme zu, so ist zu erwarten, daß je reiner das Ferment, also je weniger Begleitstoffe ihm beigemengt sind, desto schwächer sich seine antigenen Eigenschaften gestalten werden. Als Objekt für diese Versuche wurde die Invertase gewählt.

In der Literatur finden sich nur wenige Angaben betreffend Immunisierung mit Invertasepräparaten. *Schütze* und *Bergel* (2), ebenso wie *Knäffl-Lentz* (3) konnten feststellen, daß das Serum immunisierter Tiere die Invertasewirkung nur um etwa 10 Proz. herabsetzt. Diese Hemmung ist so schwach, daß die Autoren es nicht wagen, sie als spezifisch anzusehen. *Abderhalden* und *Wertheimer* (4) haben Immunisierungsversuche mit verschiedenen Fermenten, darunter auch mit Invertasepräparaten, angestellt. Sie gelangten zu negativen Resultaten und schlugen deshalb vor, den Ausdruck „Antifermente" überhaupt fallen zu lassen. Wenn Hemmungserscheinungen durch ein Immunserum hervorgebracht werden, so kann man höchstens von einer „antifermentativen Wirkung", nicht aber von einem „Antiferment" sprechen.

Wie *Bach* und *Engelhardt*, nehmen auch *Abderhalden* und *Wertheimer* an, daß die eiweißartigen Begleitstoffe der Fermente und nicht die Fermente selber als Antigene auftreten.

Methodik.

Zur Immunisierung diente der Autolysesaft von Bierhefe. Trockene Hefe wurde mit dem doppelten Volumen Wasser übergossen und unter Toluolzusatz bei Zimmertemperatur 10 bis 12 Tage stehengelassen. Nach dieser Zeit verflüssigte sich die anfangs dicke Masse bedeutend; sie wurde durch große Faltenfilter filtriert und das Filtrat unter Toluol aufbewahrt. Die zu immunisierenden Kaninchen erhielten intravenös je 2 bis 5 ccm dieses Saftes in Intervallen von 5 bis 6 Tagen, im ganzen gewöhnlich fünf bis sechs Injektionen. Mit diesem Präparat wurden acht Kaninchen behandelt, wobei zwei bei der dritten Injektion unter anaphylaktischen Erscheinungen zugrunde gingen. Die übrigen ergaben Immunsera verschiedener Aktivität.

Die Inversionsversuche wurden folgendermaßen angestellt: 2 ccm Pufferlösung (n/10 Essigsäureacetatgemisch im Verhältnis 1 : 1), 2 ccm 10proz. Saccharoselösung und 5 ccm Wasser wurden mit 1 ccm der zu untersuchenden Lösung vermengt und 30 Minuten im Thermostaten bei 37° gehalten. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion durch Zusatz *Fehling*scher Lösung (10 bis 15 ccm) unterbrochen und der Invertzucker nach *Bertrand* bestimmt. Die Fermentmenge wurde so gewählt, daß sich unter den angegebenen Bedingungen etwa 20 bis 30 mg Invertzucker bildete, was einem Verbrauch von etwa 7 bis 9 ccm n/10 $KMnO_4$ entsprach.

Die Resultate sind überall in Kubikzentimetern n/10 $KMnO_4$ angegeben.

Wirkung des Immunserums in Lösung.

1 ccm Fermentlösung und 1 ccm auf das Zehnfache verdünnten Serums wurden bei Zimmertemperatur 30 Minuten stehengelassen. Dann wurde die Inversionsfähigkeit wie oben angegeben bestimmt.

Tabelle I.

Versuche	ccm n/10 $KMnO_4$			
	1	2	3	4
Invertase + Normalserum	8,3	7,3	6,0	7,6
Invertase + Immunserum	7,0	6,6	5,9	6,6

Die Zahlen der Tabelle I bestätigen in vollem Maße die Resultate von *Schütze* und *Bergell* und von *Knaffl-Lentz*, welche fanden, daß das Serum mit Hefeinvertase behandelter Kaninchen nur einen geringen

Einfluß auf die Wirkung des Ferments ausübt. Auch die Größe der Hemmung stimmt mit den Angaben der genannten Forscher überein. Sie beträgt etwa 10 bis 15 Proz.

Wirkung des Immunserums im adsorbierten Zustande.

Durch die oben angeführten Versuche ist das antifermentative Vermögen des Immunserums nicht mit hinreichender Klarheit festgestellt worden. Um dem anfangs aufgestellten Ziele näher zu kommen, war es erforderlich, eine Methode anzuwenden, welche es ermöglichen würde, die antifermentativen Eigenschaften des Immunserums deutlicher zum Vorschein zu bringen.

Von *Nelson* und seinen Mitarbeitern (5) wurde dargetan, daß die Invertase auch im adsorbierten Zustande ihre Aktivität vollständig behält. Wenn man die Inaktivierung eines Ferments durch ein Immunserum als einen Adsorptionsprozeß betrachtet, so ist zu erwarten, daß die Invertase, auch nachdem sie durch das Immunserum gebunden worden ist, den größten Teil ihrer Aktivität beibehalten wird. Fixiert man daher das Immunserum an einem geeigneten Adsorbens [vgl. *Engelhardt* (6)] und schüttelt dann mit Invertaselösung, so wird das Ferment durch das Immunserum gebunden und kann zusammen mit dem Serumadsorbat aus der Lösung (z. B. durch Zentrifugieren) entfernt werden.

Versuche, welche in dieser Richtung nach der von *Engelhardt* (l. c.) vorgeschlagenen Methode angestellt wurden, bestätigten diese Voraussetzung vollständig.

1 ccm zehnfach verdünnten Serums wurde mit 1 ccm Acetatpuffer und dann mit 1 ccm 10proz. Kaolinsuspension versetzt. Der Niederschlag wurde einmal an der Zentrifuge mit destilliertem Wasser nachgewaschen, in 2 ccm Pufferlösung aufgeschwemmt, 5 ccm Wasser und 1 ccm Invertaselösung zugesetzt und alles bei Zimmertemperatur 30 Minuten stehengelassen. Dann wurde zentrifugiert, der Abguß in einen Erlenmeyerkolben übergeführt, mit 2 ccm 10proz. Saccharoselösung versetzt und im Thermostaten bei 17° eine halbe Stunde aufbewahrt. Nach Verlauf dieser Frist wurde die Inversion durch Zusatz von *Fehling*scher Lösung unterbrochen und der Invertzucker nach *Bertrand* bestimmt. Nach der Menge des gebildeten Invertzuckers konnte man dann die Menge des frei gebliebenen Ferments beurteilen.

In Tabelle II sind die Resultate der Versuche mit Seren verschiedener Tiere zusammengestellt.

Tabelle II.

Versuche	ccm n/10 $KMnO_4$						
	1	2	3	4	5	6	7
Invertase allein	8,6	8,0	6,5	7,4	7,3	7,5	9,7
Invertase + (Kaolin-Normalserum)	8,0	7,2	5,6	6,6	7,0	7,3	8,7
Invertase + (Kaolin-Immunserum)	0,0	0,5	0,2	0,0	0,8	0,8	2,2

In der zitierten Arbeit von *Engelhardt* konnte die antifermentative Wirkung antiphenolatischer Immunsera nachgewiesen werden, nachdem das Serum an verschiedenen Adsorbenzien — Kaolin, Tonerdehydrat, Eisenhydroxyd, Kohle — fixiert worden war. Bei den Versuchen mit Invertase konnte nur Kaolin angewandt werden. Während letzteres, mit Normalserum digeriert, die Invertase beinahe gar nicht adsorbiert, behalten Eisen- und Aluminiumhydroxyd unter denselben Bedingungen ihre Fähigkeit, Invertase stark zu adsorbieren.

Außer Kaolin erwies es sich als möglich, das Antiferment an phosphormolybdänsaurem Ammonium zu adsorbieren. In den von uns angewandten Mengen (1 ccm 25proz. Suspension) adsorbiert diese Substanz die Invertase nur spurenweise, nachdem sie aber mit Immunserum digeriert worden ist, bindet das Adsorbat das Ferment energisch. Im Gegensatz zum Kaolin wurde bei den Versuchen mit phosphormolybdänsaurem Ammonium das Digerieren des Adsorbens mit dem Serum und darauf des Adsorbats mit der Invertaselösung ohne Pufferzusatz vorgenommen. Das Puffergemisch wurde nur vor dem Einstellen in den Thermostaten zugesetzt. Die Suspension des phosphormolybdänsauren Ammoniums muß frisch bereitet sein. Die mit phosphormolybdänsaurem Ammonium erhaltenen Resultate sind in Tabelle III zusammengebracht.

Tabelle III.

Versuche	ccm n/10 $KMnO_4$		
	1	2	3
Invertase allein	8,5	8,4	7,8
Invertase + phosphor-molybdänsaures Ammonium .	8,4	8,0	7,1
Dasselbe + Normalserum	8,3	7,1	6,5
Dasselbe + Immunserum	1,8	1,5	0,7

Inaktivierung des Immunserums.

Wird das Immunserum auf 80° während 30 Minuten erhitzt, so verliert es seine antifermentativen Eigenschaften. Das Serum wurde im adsorbierten Zustande inaktiviert. Als Beispiel seien folgende Resultate angeführt.

Tabelle IV.

Versuche		ccm n/10 $KMnO_4$	
		1	2
Serum, unvorbehandelt	Normal	7,0	7,6
	Immun	0,8	0,0
Serum, 30′ bei 82° aufbewahrt	Normal	6,7	8,1
	Immun	6,3	7,1

Das Erhalten der Aktivität der Invertase nach dem Binden durch das am Kaolin adsorbierte Immunserum.

Trifft unsere Annahme über den Mechanismus der Wirkung des Anti-Invertaseserums zu, so ist zu erwarten, daß das Enzym, nachdem es durch das am Kaolin adsorbierte Immunserum gebunden worden ist, seine invertierende Aktivität behalten wird. Um diese Voraussetzung nachzuprüfen, wurde folgender Versuch angestellt. Am Kaolin adsorbiertes Immunserum wurde mit Invertaselösung versetzt, nach 30 Minuten wurde das Kaolin abzentrifugiert, das Adsorbat mit Wasser nachgewaschen und in das oben erwähnte Reaktionsgemisch von Wasser, Puffer und Saccharose eingetragen. Nach 60 Minuten langem Verweilen im Thermostaten wurde wieder zentrifugiert und dem Abguß zwei gleiche Proben entnommen. In der ersten wurde der Invertzucker sofort bestimmt, die andere wurde noch weitere 60 Minuten im Thermostaten aufbewahrt. Wäre das Enzym in Lösung gegangen, so würde in der zweiten Portion die Inversion weiter fortschreiten. Falls wir in beiden Proben eine gleiche Menge reduzierenden Zuckers vorfinden würden, wäre das dahin zu deuten, daß das Ferment seine Fähigkeit im gebundenen Zustande ausübt. Der Versuch ergab folgende Resultate:

Tabelle V.

Versuche		ccm n/10 $KMnO_4$
Invertase allein		3,7
Invertase mit Kaolinserum-Adsorbat digeriert	Normalserum	3,3
	Immunserum	0,0
Normalserum-Adsorbat mit Invertase digeriert	1. Portion	0,7
	2. Portion	0,7
Immunserum-Adsorbat mit Invertase digeriert	1. Portion	2,65
	2. Portion	2,70

Es ist aus den angeführten Ergebnissen zu ersehen, daß das am adsorbierten Immunserum gebundene Enzym seine invertierende Fähigkeit beibehält und seine Tätigkeit ausübt, ohne in Lösung zu gehen.

Es könnte nun die Frage entstehen, ob nicht das Immunserum nur dann die Fähigkeit gewinnt, die Invertase zu binden, wenn es vorher am Kaolin adsorbiert worden ist. Diese Frage ist zu verneinen, denn es konnte gezeigt werden, daß auch in Lösung eine Bindung zwischen Enzym und Immunserum entsteht. Wenn man nämlich die Invertase mit normalem Serum vermischt und dann die Proteine des letzteren durch eine geeignete Menge alkoholischer Zinkacetatlösung nieder-

In der zitierten Arbeit von *Engelhardt* konnte die antifermentative Wirkung antiphenolatischer Immunsera nachgewiesen werden, nachdem das Serum an verschiedenen Adsorbenzien — Kaolin, Tonerdehydrat, Eisenhydroxyd, Kohle — fixiert worden war. Bei den Versuchen mit Invertase konnte nur Kaolin angewandt werden. Während letzteres, mit Normalserum digeriert, die Invertase beinahe gar nicht adsorbiert, behalten Eisen- und Aluminiumhydroxyd unter denselben Bedingungen ihre Fähigkeit, Invertase stark zu adsorbieren.

Außer Kaolin erwies es sich als möglich, das Antiferment an phosphormolybdänsaurem Ammonium zu adsorbieren. In den von uns angewandten Mengen (1 ccm 25proz. Suspension) adsorbiert diese Substanz die Invertase nur spurenweise, nachdem sie aber mit Immunserum digeriert worden ist, bindet das Adsorbat das Ferment energisch. Im Gegensatz zum Kaolin wurde bei den Versuchen mit phosphormolybdänsaurem Ammonium das Digerieren des Adsorbens mit dem Serum und darauf des Adsorbats mit der Invertaselösung ohne Pufferzusatz vorgenommen. Das Puffergemisch wurde nur vor dem Einstellen in den Thermostaten zugesetzt. Die Suspension des phosphormolybdänsauren Ammoniums muß frisch bereitet sein. Die mit phosphormolybdänsaurem Ammonium erhaltenen Resultate sind in Tabelle III zusammengebracht.

Tabelle III.

Versuche	ccm n/10 $KMnO_4$		
	1	2	3
Invertase allein	8,5	8,4	7,8
Invertase + phosphor-molybdänsaures Ammonium .	8,4	8,0	7,1
Dasselbe + Normalserum	8,3	7,1	6,5
Dasselbe + Immunserum	1,8	1,5	0,7

Inaktivierung des Immunserums.

Wird das Immunserum auf 80° während 30 Minuten erhitzt, so verliert es seine antifermentativen Eigenschaften. Das Serum wurde im adsorbierten Zustande inaktiviert. Als Beispiel seien folgende Resultate angeführt.

Tabelle IV.

Versuche		ccm n/10 $KMnO_4$	
		1	2
Serum, unvorbehandelt	Normal	7,0	7,6
	Immun	0,8	0,0
Serum, 30' bei 82° aufbewahrt	Normal	6,7	8,1
	Immun	6,3	7,1

Das Erhalten der Aktivität der Invertase nach dem Binden durch das am Kaolin adsorbierte Immunserum.

Trifft unsere Annahme über den Mechanismus der Wirkung des Anti-Invertaseserums zu, so ist zu erwarten, daß das Enzym, nachdem es durch das am Kaolin adsorbierte Immunserum gebunden worden ist, seine invertierende Aktivität behalten wird. Um diese Voraussetzung nachzuprüfen, wurde folgender Versuch angestellt. Am Kaolin adsorbiertes Immunserum wurde mit Invertaselösung versetzt, nach 30 Minuten wurde das Kaolin abzentrifugiert, das Adsorbat mit Wasser nachgewaschen und in das oben erwähnte Reaktionsgemisch von Wasser, Puffer und Saccharose eingetragen. Nach 60 Minuten langem Verweilen im Thermostaten wurde wieder zentrifugiert und dem Abguß zwei gleiche Proben entnommen. In der ersten wurde der Invertzucker sofort bestimmt, die andere wurde noch weitere 60 Minuten im Thermostaten aufbewahrt. Wäre das Enzym in Lösung gegangen, so würde in der zweiten Portion die Inversion weiter fortschreiten. Falls wir in beiden Proben eine gleiche Menge reduzierenden Zuckers vorfinden würden, wäre das dahin zu deuten, daß das Ferment seine Fähigkeit im gebundenen Zustande ausübt. Der Versuch ergab folgende Resultate:

Tabelle V.

Versuche		ccm n/10 $KMnO_4$
Invertase allein		3,7
Invertase mit Kaolinserum-Adsorbat digeriert	Normalserum	3,3
	Immunserum	0,0
Normalserum-Adsorbat mit Invertase digeriert	1. Portion	0,7
	2. Portion	0,7
Immunserum-Adsorbat mit Invertase digeriert	1. Portion	2,65
	2. Portion	2,70

Es ist aus den angeführten Ergebnissen zu ersehen, daß das am adsorbierten Immunserum gebundene Enzym seine invertierende Fähigkeit beibehält und seine Tätigkeit ausübt, ohne in Lösung zu gehen.

Es könnte nun die Frage entstehen, ob nicht das Immunserum nur dann die Fähigkeit gewinnt, die Invertase zu binden, wenn es vorher am Kaolin adsorbiert worden ist. Diese Frage ist zu verneinen, denn es konnte gezeigt werden, daß auch in Lösung eine Bindung zwischen Enzym und Immunserum entsteht. Wenn man nämlich die Invertase mit normalem Serum vermischt und dann die Proteine des letzteren durch eine geeignete Menge alkoholischer Zinkacetatlösung nieder-

schlägt, so wird das Enzym vom Niederschlag nicht mitgerissen. Stellt man aber denselben Versuch mit Immunserum an, so geht die Invertase in den Niederschlag über. Suspendiert man nun den Niederschlag im gewöhnlichen Reaktionsgemisch aus Wasser, Puffer und Saccharose, so kann man sich leicht überzeugen, daß das Enzym auch in diesem Falle seine Aktivität beibehalten hat.

II.

Die Ergebnisse der oben angeführten Versuche lassen noch nicht entscheiden, ob das aktive Enzymmolekül oder die ihm beigemengten eiweißartigen Begleitstoffe als Antigene fungieren. Um diese Frage zu entscheiden, wurden Versuche in zwei Richtungen angestellt: 1. Immunisierung mit gereinigten Fermentpräparaten und 2. Immunisierung mit inaktiviertem Ferment. Wir gingen dabei von folgenden Überlegungen aus: fungiert als Antigen das aktive Enzymmolekül, so muß die Immunisierung mit gereinigten Präparaten zu ebenso aktiven Immunsera wie mit ungereinigten führen. Andererseits aber wäre bei der Immunisierung mit inaktiviertem Ferment überhaupt kein Immunserum zu erwarten. Wenn aber als Antigen die eiweißartigen Begleitstoffe dienen, so dürften die antifermentativen Eigenschaften des Immunserums desto schwächer sein, je reiner das zur Immunisierung angewandte Präparat war.

Immunisierung mit gereinigten Invertasepräparaten.

Es wurden zu diesen Versuchen vier Kaninchen genommen. Die Zahl der Injektionen, die Menge des eingeführten Ferments und die übrige Methodik waren genau dieselben, wie bei den oben beschriebenen Versuchen. Die Reinigung der Invertase wurde nach *Euler* und *Kullberg* (7) ausgeführt. Derselbe Autolysesaft, welcher in den ersten Versuchen zur Immunisierung angewandt war, wurde mit Bleiacetat behandelt. Dabei wurde der größte Teil der Proteine niedergeschlagen, das Enzym blieb dagegen in Lösung. Die abfiltrierte Lösung wurde mit Alkohol bis zu einem Gehalt von 48 Proz. versetzt, der Niederschlag in Wasser gelöst, mit Kaolin behandelt und abermals mit Alkohol ausgefällt. Der Niederschlag, mit absolutem Alkohol verrieben und abgenutscht, ergab ein weißes Pulver, welches im Exsikkator über Chlorcalcium getrocknet wurde. Zur Immunisierung wurde eine Lösung dieses Präparats genommen, welche ihrer Aktivität nach derjenigen des ursprünglichen Autolysesaftes entsprach. Diese Lösung gab nur eine schwach positive Reaktion mit dem *Spiegler*schen Eiweißreagens. Die Resultate der Immunisierung waren folgende:

Tabelle VI.

Versuchstier Nr.:	ccm n/10 $KMnO_4$ 1	2	3	4
Invertase allein	6,6	7,4	6,7	7,0
Invertase + (Kaolin-Normalserum) . . .	6,3	7,1	6,2	6,7
Invertase + (Kaolin-Immunserum) . . .	4,4	4,6	4,2	3,8

Wir sehen somit, daß die antifermentativen Eigenschaften der Immunsera bei der Immunisierung mit gereinigten Fermentpräparaten schwächer ausgesprochen sind als bei der Immunisierung mit Autolysesaft. Während in letzterem Falle die durch Immunserum erzeugte Hemmung 75 bis 100 Proz. betrug, war sie bei Anwendung von gereinigten Präparaten nur 30 bis 40 Proz.

Immunisierung mit inaktivierter Invertase.

Zu den Versuchen wurden vier Kaninchen genommen. Zwei von ihnen wurden mit Autolysesaft immunisiert, welcher durch Erwärmen im Wasserbade bei 68° während 30 Minuten inaktiviert worden war. Zur Immunisierung des anderen Paares wurde Autolysesaft angewandt, welcher in kochendem Wasser 40 Minuten gehalten war. Der nach dem Erhitzen gebildete Niederschlag wurde abfiltriert. Kontrollversuche zeigten in beiden Fällen eine vollständige Unwirksamkeit der Präparate sowohl am Anfang als auch am Ende der Immunisierung. Dies ist deswegen von Bedeutung, weil in der Literatur Angaben über Regeneration inaktivierter Enzyme vorhanden sind. Die Tabelle VII gibt die Resultate dieser Immunisierungsversuche wieder.

Tabelle VII.

Versuchstier Nr.:	ccm n/10 $KMnO_4$ 1	2	3	4
Invertase allein	8,0	8,0	8,6	8,6
Invertase + (Kaolin-Normalserum) . . .	7,5	7,5	7,4	7,4
Invertase + (Kaolin-Immunserum) . . .	5,9	2,6	1,3	5,4

Man sieht, daß der inaktivierte Autolysesaft, trotz voller Unwirksamkeit des Enzyms, seine antigenen Eigenschaften nicht eingebüßt hat. Die antifermentative Wirkung der Immunsera ist recht gut ausgesprochen. Die angeführten Zahlen entsprechen den Sera, welche nach sechs Injektionen gewonnen waren. Nach einer weiteren Injektion konnte das Serum vom Kaninchen Nr. 3 die ganze angewandte Fermentmenge binden.. Mit den gereinigten Präparaten gaben auch weitere Injektionen kein Ansteigen der antifermentativen Kraft des Serums.

Zusammenfassung.

1. Injektionen von Invertasepräparaten führen bei Kaninchen zur Bildung von anti-invertatischen Immunsera.

2. Die fermentbindende Eigenschaft dieser Immunsera kann nachgewiesen werden, wenn man die Proteine des Immunserums an einem geeigneten Adsorbens fixiert.

3. Halbstündiges Erwärmen bei 80° hebt die antifermentative Eigenschaft des Immunserums fast vollständig auf.

4. Das Enzym behält seine Aktivität auch nachdem es durch das Immunserum gebunden ist.

5. Gereinigte Invertasepräparate geben bei der Immunisierung schwächere Immunsera als ungereinigte Präparate (Autolysesaft) gleicher Aktivität.

6. Durch Hitze inaktiviertes Ferment besitzt die Fähigkeit, Immunsera zu erzeugen.

7. Auf Grund der unter 5. und 6. angeführten Ergebnisse läßt sich der Schluß ziehen, daß bei der Immunisierung mit Invertasepräparaten nicht die aktiven Enzymmoleküle, sondern die dem Ferment vergesellschafteten Begleitstoffe als Antigene fungieren.

Literatur.

1) *Bach* und *Engelhardt*, diese Zeitschr. **148**, 456, 1924. — 2) *Schütze* und *Bergell*, Zeitschr. f. klin. Med. **61**, 366, 1907. — 3) *Knaffl-Lentz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **120**, 110. — 4) *Abderhalden* und *Wertheimer*, Fermentforsch. 6. 286, 1923. — 5) *Nelson* und *Griffin*, Journ. Amer. Chem. Soc. **38**, 1109, 1916; *Nelson* und *Hitchcock*, ebendaselbst **43**, 1956, 1921. — 6) *Engelhardt*, diese Zeitschr. **148**, 463, 1924. — 7) *Euler* und *Kullberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**, 335.

Neue Beiträge zur Frage über den Einfluß des Thyreoidins auf die alkoholische Gärung. II.

Von

L. P. Rosenow.

(Aus dem physiologischen Institut der Staatsuniversität Minsk.)

(Eingegangen am 1. Mai 1925.)

Bei der näheren Untersuchung des Einflusses des Thyreoidins auf die anaerobe Atmung der Hefe (1) ergaben sich einige Schwierigkeiten, deren Ursache in der Unlöslichkeit des Thyreoidins beruhte.

In gleicher Weise wurde auch die Genauigkeit der von mir unternommenen Versuche über die Wirkung des Thyreoidins auf die Funktionen der Kopfhirnrinde eines Hundes beeinträchtigt. Die Wirkung des Thyreoidins untersuchte ich nach der Methode der Bedingungsspeichelreflexe: es war nicht festzustellen, wann und wo das Thyreoidin resorbiert wird und zu welchem Zeitpunkt die höchste Wirksamkeit zu erwarten ist. Über die bei einem Hunde erzielten Resultate werde ich in einer anderen Abhandlung berichten; an dieser Stelle teile ich nur die von mir mit Hefe erhaltenen Ergebnisse mit.

Es erwies sich als notwendig, ein Lösungsmittel für das Thyreoidin aufzufinden, um die Möglichkeit einer Einwirkung desselben auf Hefe zu erreichen.

Schon *Baumann* und *Roos* (2) wiesen darauf hin, daß das Thyreoidin der Wirkung der Verdauungsfermente widersteht. Ferner empfahl *N. E. Wedensky* (3) im Jahre 1897, das Thyrojodin (nicht das käufliche Thyreoidin) durch Verdauung der Schilddrüsen mit Hilfe des Magensafts zu erhalten: fast alles wird gelöst, das Thyrojodin jedoch bleibt im Bodensatz zurück. Das Jodothyrin muß sich in siedendem Alkohol (90 proz.) und in Alkalien auflösen. Was das Thyreoidin anbetrifft, so versuchte ich folgende Lösungsmittel: kaltes, warmes und siedendes Wasser, kalten und kochenden Äthylalkohol, Glycerin, Ammoniaklösungen, n/10 NaOH, Harnstoff, Blutserum, siedendes Naphthalin (218°), Antipyrin, Chloroform, Äther, Magensaft vom Hunde (Säuregehalt 60, Verdauungsstärke nach *Mett* 3,0). In letzterem Lösungsmittel sowie auch in den übrigen angewandten Solvenzien war auch nach dreitägigem Stehen im Thermostaten keine Lösung erfolgt.

Dennoch weist die von mir festgestellte Tatsache, daß eine Gärungsbeschleunigung trotzdem stattfindet, darauf hin, daß irgend ein Bestandteil in Lösung geht.

Es mußte ermittelt werden, ob bei dieser Verstärkung der Gärung die oben genannte unlösliche kristallinische Substanz irgend eine Rolle spielt.

Die Versuche wurden auf folgende Weise angestellt:

15,0 g käuflichen Thyreoidins in Tabletten[1]) (*Poehl*), entsprechend 5,0 g reinen Thyreoidins, wurden in heißem Wasser aufgelöst und das Wasser bis zum vollständigen Verschwinden von Trübung und Geruch mehrmals abgegossen. Dabei wurde auch ein Teil der ungelösten feinen Kristalle entfernt. Alsdann wurde der ungelöste Bodensatz mit Alkohol, darauf mit Äther ausgewaschen und getrocknet. Die Menge des nach diesem Verfahren erhaltenen kristallinischen Pulvers (in größeren Kristallen) betrug 2,4 bis 3,5 g.

Tabelle I zeigt einen Versuch, der mit dem erhaltenen wässerigen Extrakt ausgeführt wurde. Dieser besaß ein trübes Aussehen; die kristallinische Substanz setzte sich bald zu Boden, doch blieb die Flüssigkeit auch am zweiten Tage ebenso trübe. Für den Versuch wurde der obere abgestandene Teil dekantiert, der trübe, jedoch ohne Kristallsatz war.

Tabelle I.

Versuch vom 4. April 1925; aufgestellt um 8 Uhr 50 Minuten.

Nr.	Zeit:	9h 15′	9h 30′	9h 45′	10h	10h 15′	10h 30′
1	Wässeriger Extrakt von „Thyreoidin" 50,0 ccm Zucker 5,0 g Hefe 6,0 g	Anfang	6	22	41	60	77
2	Wasser 50,0 ccm Zucker 5,0 g Hefe 6,0 g	0	Anfang	5	10	15	25
3	wie Nr. 1	Anfang	5	18	35	55	75
4	wie Nr. 2	0	Anfang	2	7	12	22

Höhe der Säule des CO_2 in Millimetern.

Der Extrakt wurde für diesen Versuch auf oben beschriebene Weise bereitet, wobei nur der in einer Menge von 150,0 ccm gewonnene wässerige Auszug angewandt wurde.

Das Gewicht des ungelösten Thyreoidins betrug 3,4 g + x (der bedeutende Bodensatz in den Waschwässern). Die Menge von x erwies sich = 2,2 g.

Wie aus der Tabelle I ersichtlich ist, trat eine starke Beschleunigung des Gärungsprozesses ein.

Der Versuch mit dem ungelösten Pulver ergab, laut Tabelle II, folgendes Resultat:

[1]) In den vorher beschriebenen Versuchen mit Hefe verwandte ich das Thyreoidin von *Poehl* in Pulverform, d. h. frei von Salzen und bindenden Zusätzen.

Tabelle II.

Versuch vom 5. April 1925; aufgestellt um 2 Uhr 25 Minuten.

Nr.	Zeit:	2h 45'	3h 30'	4h	4h 15'	4h 45'	5h	5h 15'
1	Wasser 50,0 ccm Ausgewaschenes Thyreoidin 1,1 g Hefe 6.0 g Zucker 3.0 g	0	12	30	Wieder durchgerührt, eingegossen und hingestellt.	17	26	43
2	Wasser 50,0 ccm Hefe 6,0 g Zucker 3,0 g	Anfang	14	32		22	34	45
3	Dasselbe wie in Nr. 1, nur ist das Thyreoidin zuerst aufgekocht	0	Anfang	9		19	29	40
4	wie Nr. 2	Anfang	12	30		24	36	50

Höhe der Säule des CO_2 in Millimetern.

Aus Tabelle II geht hervor, daß das Pulver die Gärung nicht nur nicht verstärkt, sondern sie vermindert oder (in anderen Versuchen) nicht verändert, wahrscheinlich durch seine mechanische Einwirkung, indem es sich zwischen den Hefezellen verteilt. Hierbei war es vollständig gleich, ob das Pulver direkt in kaltem Wasser oder zuerst in kochendem aufgelöst wurde. Anscheinend ist es weder in diesem noch in jenem löslich.

Schlußfolgerungen.

1. Das käufliche Thyreoidin erweist sich infolge der Unlöslichkeit seiner Hauptmenge als nicht aktiv.

2. Das käufliche Thyreoidin enthält in ungleichen Mengen Zusätze, die entweder ein Produkt der Schilddrüsensekretion darstellen oder nicht genügend ausgewaschene Stoffe sind, die sich bei der Gewinnung des Thyreoidins gebildet haben.

3. Letztere Stoffe sind Stimulatoren der alkoholischen Gärung.

Literatur.

1) *L. P. Rosenow*, diese Zeitschr. **159**, 235, 1925. — 2) *Baumann* und *Roos*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **21** und **22**. — 3) *Frederik* und *Nüel*, Übersetzung, redigiert und mit Anmerkungen versehen von *N. E. Wedensky* 1897. — 4) *M. Tomita*, diese Zeitschr. **181**, H. 1/2. — 5) *C. Neuberg*, *E. Reinfurth*, *M. Ehrlich* und *M. Sandberg*, ebendaselbst 1918 bis 1921.

Untersuchungen über Leber- und Blutkatalase. II.

Von

P. Rona, A. Fiegel und Y. Nakahara.

Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität, Berlin.)

(Eingegangen am 13. Mai 1925.)

Mit 18 Abbildungen im Text.

I.

Unsere Kenntnisse über die Katalase erfuhren jüngst eine wesentliche Förderung durch die Arbeit von *Morgulis*, der die Kinetik der Katalasewirkung weitgehend aufgeklärt hat. Über die Salzwirkung auf die Katalase liegt eine große Anzahl wertvoller Befunde vor[1]), wenn auch manche wichtige Punkte noch unerledigt geblieben sind. Wir wollen uns zunächst mit der Wirkung des KCN auf die Katalase beschäftigen.

Daß KCN ein starkes Gift für Katalase ist, ist eine längst bekannte Tatsache. Bemerkenswert ist hierbei jedoch, — worauf bereits ältere Autoren hingewiesen haben[2]) —, daß die mit KCN vergiftete Katalase sich nach einer bestimmten Zeit erholt und dann fast ebenso wirksam ist wie die frische, unvergiftete Fermentlösung. Diese Reversibilität der Giftwirkung soll in folgendem einer näheren Untersuchung unterzogen werden.

Die Versuchsanordnung war dieselbe wie in der früheren Mitteilung über Katalase[3]). Das Ferment (wässeriger Preßsaft aus Kalbsleber) wurde nach der Vorschrift von *Sörensen* dargestellt[4]) und von der Stammlösung in einer Verdünnung von 1 : 400 bis 1 : 800 je 5 ccm zum Versuch benutzt. Das Gesamtvolumen betrug stets 20 ccm und setzte sich zusammen aus 5 ccm m/50 Pufferlösung, 5 ccm der KCN-Lösung (von bestimmter Konzentration) 5 ccm 3proz. Wasserstoffsuperoxyds (Perhydrol-*Merck*) und

[1]) Vgl. vor allem die Arbeit von *Michaelis* und *Pechstein*, diese Zeitschr. **53**, 320, 1913, und die von *Santesson*, Skand. Arch. f. Phys. **44**, 262, 1923. — Bezüglich der Literatur verweisen wir auf die lesenswerte Monographie von *Morgulis* in den Ergebnissen der Physiologie **23**, 308, 1924.

[2]) Vgl. die Literatur bei *Santesson*.

[3]) Diese Zeitschr. **134**, 20, 1922.

[4]) Ebendaselbst **21**, 131, 1909.

5 ccm Fermentlösung. Diese Flüssigkeiten wurden in Erlenmeyerkolben zusammengebracht (wenn nicht anders angegeben) derart, daß das H_2O_2 und die Fermentlösung erst unmittelbar vor Beginn des Versuchs zugesetzt wurden. Die Kolben wurden, wie *Morgulis* angegeben, auf einem Schüttelapparat fixiert, der entwickelte Sauerstoff in Eudiometerröhren aufgefangen und das Volumen in bestimmten Zeitabschnitten abgelesen. Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration in den Versuchsflüssigkeiten wurde nach völliger Zerstörung des etwa noch vorhandenen H_2O_2 durch erneuten Fermentzusatz im allgemeinen nach der elektrometrischen Methode vorgenommen, bei Gegenwart von KCN kolorimetrisch nach *Michaelis*.

Versuch 1, dessen Verlauf in der Abb. 1 wiedergegeben ist, wobei der zu bestimmten Zeiten (Ordinate) entwickelte Sauerstoff (Abszisse)

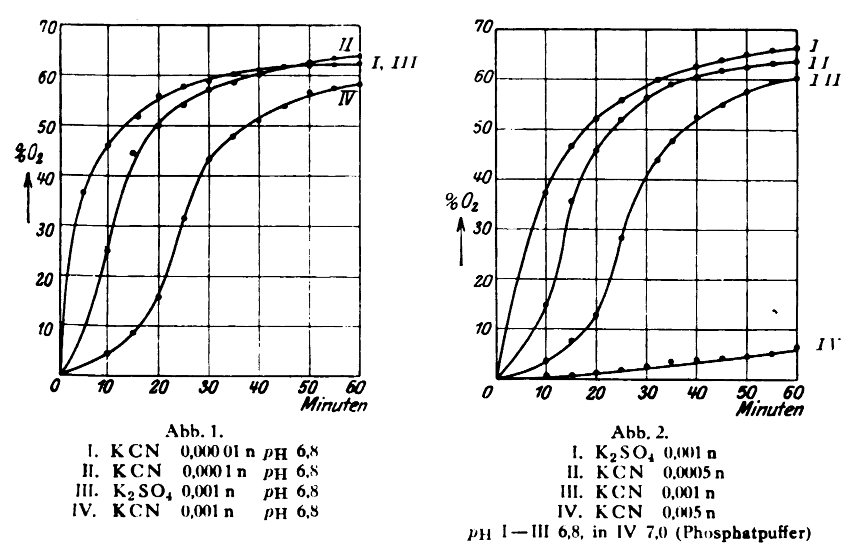


Abb. 1.
I. KCN 0,00001 n pH 6,8
II. KCN 0,0001 n pH 6,8
III. K_2SO_4 0,001 n pH 6,8
IV. KCN 0,001 n pH 6,8

Abb. 2.
I. K_2SO_4 0,001 n
II. KCN 0,0005 n
III. KCN 0,001 n
IV. KCN 0,005 n
pH I—III 6,8, in IV 7,0 (Phosphatpuffer)

in Prozenten der maximalen, aus dem H_2O_2 entwickelbaren Sauerstoffmenge angegeben ist, veranschaulicht diese Vorgänge. Bei einer Konzentration von 0,00001 n des zugesetzten KCN läßt sich noch keine Wirkung erkennen, bei 0,0001 n zeigt sich aber schon die typische Erscheinung, daß die O_2-Entwicklung erst nur langsam vor sich geht, dann nach einer gewissen Zeit die Spaltung zunimmt und den dem Kontrollversuch (ohne KCN) entsprechenden Verlauf nimmt.

Versuch 2, Abb. 2 und Versuch 3, Abb. 3 zeigen die Abhängigkeit der Erholungszeit des Ferments von der Giftkonzentration ebenfalls deutlich.

Ferner wurde untersucht, ob diese Erscheinung mit der Dauer der Berührung der Katalase mit dem Gift in Zusammenhang steht. Die verdünnte Fermentlösung wurde mit KCN einmal in einer Konzentration von 0,001 n, dann von 0,0005 n, je 15 Minuten, 30 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden in Kontakt gebracht und erst nach Ablauf dieser Zeit

H_2O_2 zugesetzt. Ein Einfluß ließ sich in keinem Falle nachweisen (Versuch 4 und 5, Abb. 4 und 5). Die Vergiftung des Ferments

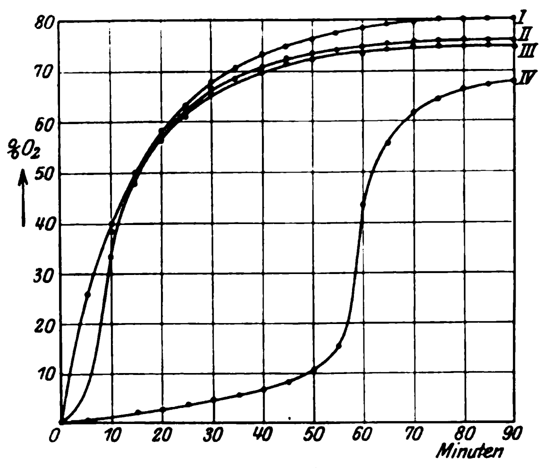


Abb. 3.
I. KCN 0,001 n. II. ohne Salz. III. KCl 0,001 n.
IV. KCN 0,005 n.
pH I—IV 6,8 (Phosphatpuffer)

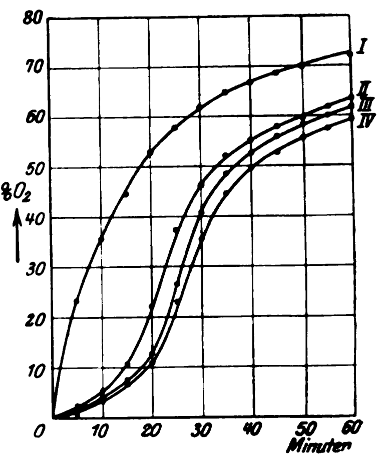


Abb. 4.
I. K_2SO_4 0,001 n (Berührung 30 Min.)
II. KCN 0,001 n („ 30 „)
III. KCN 0,001 n („ 15 „)
IV. KCN 0,001 n (sofort)
pH I—IV 6,8 (Phosphatpuffer)

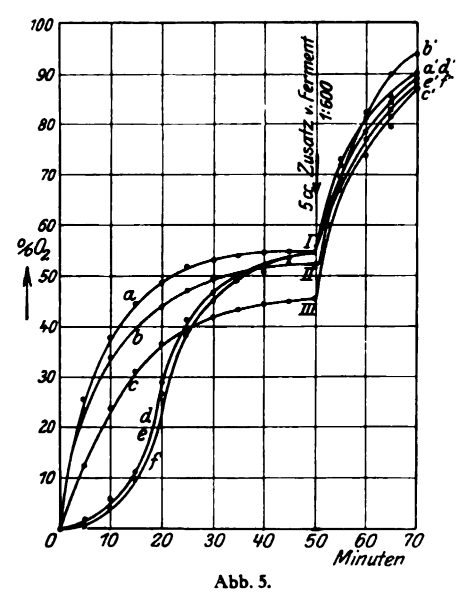


Abb. 5.
a — I — a' K_2SO_4 0,001 n (sofort)
b — II — b' K_2SO_4 0,001 n (nach 1 Std.)
c — III — c' K_2SO_4 0,001 n („ 2 Stdn.)
d — I — d' KCN 0,001 n (sofort)
e — I — e' KCN 0,001 n (nach 1 Std.)
f — I — f' KCN 0,001 n („ 2 Stdn.)
pH 6,8 (Phosphatpuffer)

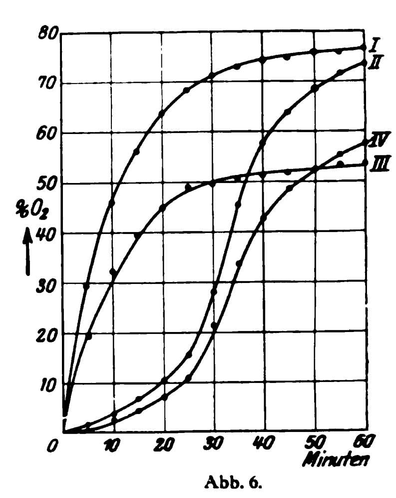


Abb. 6.
I. KCl 0,002 n } mit ungereinigtem
II. KCN 0,002 n } Ferment
III. KCl 0,002 n } mit gereinigtem Ferment
IV. KCN 0,002 n }
pH 6,8 (Phosphatpuffer)

erfolgt demnach (praktisch) momentan und die Berührungsdauer ist ohne Belang für die Erholung und den späteren Ablauf der Katalasewirkung. Zur Untersuchung der Frage, wie sich das ganze Ferment—Gift—H_2O_2-System nach Erholung der Katalase bei erneutem Fermentzusatz verhält, wurde nach Ablauf eines Versuchs nochmals frische Fermentlösung zugesetzt und weiter 20 Minuten beobachtet (Versuch 5, Abb. 5). Es zeigte sich, daß nunmehr die O_2-Entwicklung sofort einsetzt und normal verläuft. Innerhalb der geprüften Variation der $H^{\cdot}$-Konzentration (p_H 5,9 bis 7,4) war diese ohne Einfluß auf die Wirkungsweise des KCN auf das Ferment in Gegenwart von H_2O_2; nur war die Erholung des Ferments bei neutraler Reaktion ausgiebiger als bei saurer. Ob Phosphat- oder Acetatpuffer bei den Versuchen angewandt wurde, war gleichgültig.

Um zu prüfen, ob für diese Erscheinung der nur zeitweiligen Vergiftung der Katalase durch KCN etwaige Verunreinigungen des Leberpreßsafts verantwortlich zu machen seien, sind die Versuche noch mit einer nach den Angaben von *Tsuchihashi*[1]) gereinigten Katalase angestellt und somit ist mit einem praktisch eiweißfreien Katalasepräparat gearbeitet worden.

Aus 7,6 g Na_3PO_4 und 6,57 g $CaCl_2$, 6 H_2O stellt man eine Calciumphosphatsuspension her, die bis zur Chlorfreiheit mit destilliertem Wasser gewaschen wurde. Die Suspension wird mit destilliertem Wasser auf 150 ccm aufgefüllt. 0,5 ccm dieser Suspension wurden zentrifugiert, zum Bodensatz 10 ccm der 100fach verdünnten Fermentstammlösung, die in den vorherigen Versuchen benutzt wurde, gegeben, gut umgerührt und nach 10 Minuten abzentrifugiert. Der Bodensatz wurde dreimal mit destilliertem Wasser ausgewaschen, dann mit 20 ccm m/150 sekundären Phosphats 15 Minuten lang eluiert. Nach erneutem Zentrifugieren werden 10 ccm des Auszugs mit m/15 primärem Phosphat neutralisiert. Dreifache Verdünnung dieses Präparats entspricht unserer 600fach verdünnten Stammlösung. Zum Versuch wurden davon 5 ccm gebraucht. Die Elution war eiweißfrei (Sulfosalicylsäureprobe).

In Versuch 6, Abb. 6, wurden beide Fermentpräparate mit KCl, wie auch in ihrer Wirkung bei KCN-Zusatz miteinander verglichen. Ein Unterschied in der Wirkung auf den Verlauf der H_2O_2-Spaltung ließ sich nicht erkennen.

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, daß die mit KCN vergiftete Katalase nach einer gewissen, von der Giftkonzentration abhängigen Zeit sich wieder erholt. Es blieb die Frage offen, ob die Erholung spontan trotz Anwesenheit des KCN erfolgt, oder ob sie erst nach Zerstörung des Giftes eintritt.

Es galt zunächst, genauere Beziehungen zwischen Giftkonzentration und Zeitpunkt und Grad der Erholung der Katalase festzustellen.

---

[1]) Diese Zeitschr. **140**, 63, 1923.

Die in diese Richtung fallenden Versuche sollen eingehender mitgeteilt werden.

Versuch 7. Temperatur 14°, 757,5 mm Hg. In vier Kolben wurden je 50 ccm einer 3 prom. H_2O_2-Lösung gebracht, ferner je 10 ccm m/30 Phosphatpufferlösung (p_H 6,89). Zu Kolben I wurden 10 ccm, zu Kolben II, III, IV je 8 ccm destillierten Wassers hinzugefügt, ferner zu Kolben II 2 ccm einer 0,1 n zu Kolben III 2 ccm einer 0,01 n und zu Kolben IV 2 ccm einer 0,001 n KCN-Lösung. Sofort nach dem Ansetzen der vier Kolben wurde im Abstand von je 1 Minute zu jedem Kolben je 10 ccm einer Katalaselösung (Stammlösung 1 : 2000 verdünnt) hineinpipettiert und unmittelbar darauf mit dem Schütteln begonnen. Die Ablesung des entwickelten Sauerstoffs erfolgte in Abständen von 5 Minuten. — Nach 75 Minuten wurden die Versuche I und IV, nach 155 Minuten Versuch 3, nach 215 Minuten Versuch 2 abgebrochen. Der Gesamtinhalt jedes einzelnen Kolbens betrug 80 ccm, die Konzentration an KCN daher zu Beginn des Versuchs in den Kolben II, III, IV bzw. 0,0025, 0,00025, 0,000025 n.

Der Verlauf des Versuchs ist aus der Abb. 7 ersichtlich. Der Versuch zeigt, daß bei den Versuchsbedingungen bei einer Endkonzentration

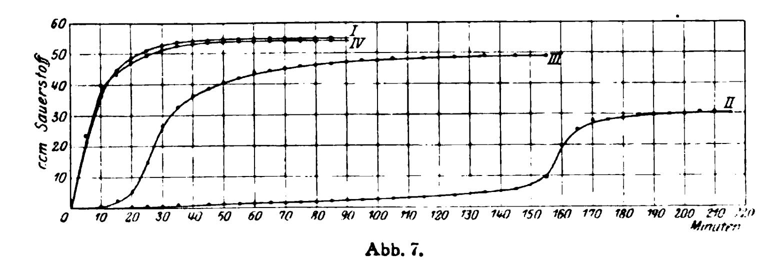


Abb. 7.

an KCN von 0,000025 n eine Giftwirkung nicht erkennbar ist; bei zehnfach stärkerer Giftkonzentration tritt nach etwa 20 Minuten eine Erholung des Ferments ein, wobei die abgespaltene gesamte Sauerstoffmenge etwa 90 Proz. der im Kontrollversuch entstandenen beträgt. Bei weiterer zehnfach stärkerer Giftkonzentration (0,0025 n KCN) erfolgt die Erholung nach 155 Minuten und die entwickelte gesamte Sauerstoffmenge beträgt etwa 55 Proz. derjenigen im Kontrollversuch. Mit wachsender Giftkonzentration erfolgt die Erholung des Ferments also entsprechend später; die Katalase erreicht jedoch nicht ihre volle Wirksamkeit: je stärker die KCN-Konzentration, desto schwächer die schließliche Fermentwirkung.

Es sollte nun weiter untersucht werden, ob während der Vergiftungsphase erneut zugesetztes Ferment sofort voll wirksam ist oder ebenfalls vergiftet wird, d. h. ob das Gift vom ersten Ferment in toto in Beschlag genommen wird. Zu diesem Zwecke erfolgte in drei Versuchen mit gleicher Giftkonzentration der Zeitpunkt des erneuten Katalasezusatzes in verschiedenen Phasen der Vergiftung.

Versuch 8. Temperatur 16°, 760 mm Hg. — In vier Kolben wurden gleichzeitig je 50 ccm 3 prom. H_2O_2-Lösung gebracht, ferner je 4 ccm m/30 primären Natriumphosphats und je 6 ccm m/30 sekundären Natriumphosphats. Zu Kolben I wurden 10 ccm, zu Kolben II bis IV je 8 ccm destillierten Wassers hinzugefügt, ferner zu Kolben II bis IV noch je 2 ccm einer 0,1 n KCN-Lösung. Die Endkonzentration an KCN war nach dem erstmaligen Zusatz von Ferment 0,0025 n. — Sofort nach dem Ansetzen der Kolben wurden im Abstand von 1 Minute je 10 ccm der Fermentlösung (Verdünnung 1 : 2000) in der Reihenfolge Kolben I, II, III, IV zugesetzt, mit dem Schütteln begonnen. Nach 40 Minuten wurde Kolben II, nach 120 Minuten Kolben III, nach 200 Minuten Kolben IV mit 10 ccm der obigen Fermentlösung beschickt. p_H im Kolben I (elektrometrisch) 7,13. — Die Erholung der Katalase trat bei Kolben II nach 150 Minuten, bei Kolben III nach 120 Minuten, bei Kolben IV nach 175 Minuten ein. Es zeigt sich also, daß das vorhandene KCN ausreicht, um die nach 40 Minuten erneut zugefügte Fermentmenge noch völlig zu vergiften, da die Erholung erst nach 150 Minuten eintritt. Nach 120 Minuten ist das KCN dagegen kaum

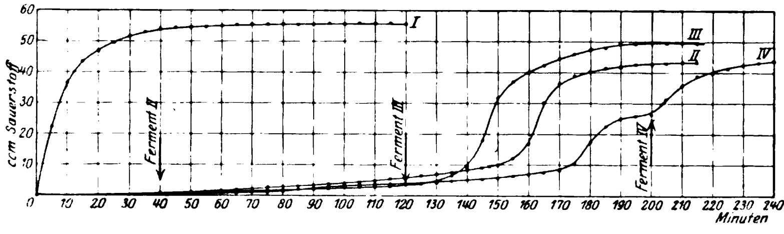


Abb. 8.

noch wirksam, da das zu Kolben III erneut zugesetzte Ferment sich schon nach 10 Minuten erholt. Bei Kolben IV wurde das Ferment zugesetzt, nachdem die Erholung schon eingetreten und die Sauerstoffentwicklung von seiten des zuerst zugefügten Ferments fast zum Abschluß gelangt war. Die Sauerstoffentwicklung, die zuerst nur etwa 50 Proz. der Gesamtmenge betragen hatte, setzte nunmehr sofort ein und führte zur weiteren Abspaltung von Sauerstoff bis zu 78 Proz. des überhaupt abspaltbaren. — Der Verlauf des Versuchs ist aus Abb. 8 ersichtlich.

Aus diesem Versuch geht hervor, daß das Gift allmählich zerstört werden muß, da das Verhältnis der zusammengebrachten Mengen von Gift und Ferment in den drei Kolben gleich war, die Giftwirkung aber im Laufe des Versuchs abnahm. Andererseits üben die aus der Umsetzung $KCN - H_2O_2$ entstehenden Produkte (Cyanat, Oxamid) ihrerseits einen hemmenden Einfluß auf die Katalase aus, da in diesen Systemen auch nach der Erholung nicht der gesamte abspaltbare Sauerstoff vom Ferment abgespalten wird. Dies zeigt auch der folgende Versuch.

Versuch 9. Temperatur 15,5°, 765 mm Hg. In vier Kolben wurden je 50 ccm 3 prom. H_2O_2-Lösung verteilt, je 10 ccm m/30 Phosphatpufferlösung (p_H 7,01, elektrometrisch) und 8,0 ccm destillierten Wassers zugefügt. Darauf wurden in jeden Kolben 2 ccm einer 0,1 n KCN-Lösung pipettiert,

die Zeit notiert, nach 5 Minuten in den Kolben I, nach 60 Minuten in den Kolben II, nach 100 Minuten in den Kolben III, nach 160 Minuten in den Kolben IV 10 ccm Fermentlösung (1 : 2000) zugefügt. — Nach 200 Minuten wurde zu allen vier Kolben erneut die gleiche Fermentmenge hinzugefügt. — Der Verlauf des Versuchs ist aus Abb. 9 ersichtlich.

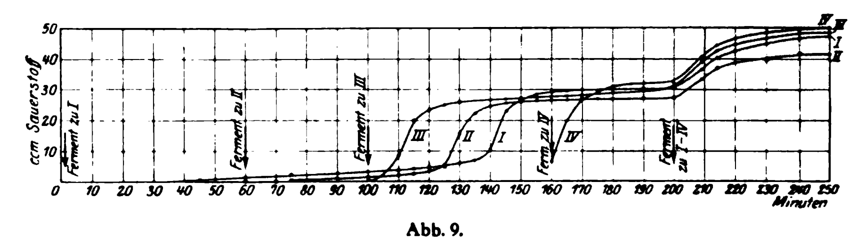


Abb. 9.

Nach 100 Minuten ist also das KCN völlig zerstört, die Katalasewirkung tritt sofort ein, zeigt aber nur etwa 60 Proz. der Wirkung, die die gleiche Menge unvergifteten Ferments hat.

Daß das Cyankalium vom Wasserstoffsuperoxyd beim Schütteln zerstört wird und die entstehenden Produkte die Wirksamkeit der Katalase beeinträchtigen, zeigt auch folgender Versuch.

Versuch 10. Temperatur 16°, 767,5 mm Hg. In zwei Kolben wurden je 50 ccm 3prom. H_2O_2-Lösung, ferner 10 ccm einer m/30 Phosphatpufferlösung (p_H 7,01, elektrometrisch) gebracht. Zu Kolben I wurden 10 ccm, zu Kolben II 8 ccm destillierten Wassers hinzugefügt. Die Kolben wurden in den Schüttelapparat gestellt, zu Kolben II 2 ccm 0,1 n KCN-Lösung pipettiert, beide Kolben verschlossen, 3 Stunden geschüttelt, dann zu beiden Kolben gleichzeitig 10 ccm einer Fermentlösung (1: 2000) zugesetzt; nach 45 Minuten die gleiche Menge zugefügt. Den Verlauf des Versuchs zeigt Abb. 10.

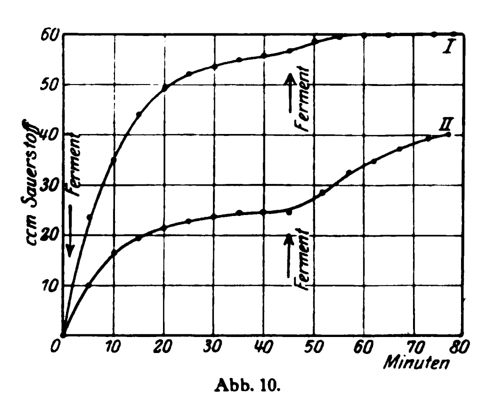


Abb. 10.

Im Kolben II beträgt demnach die entwickelte Gasmenge nur 43,3 Proz. derjenigen des Kontrollversuchs, nach dem zweiten Fermentzusatz, am Schlusse des ganzen Versuchs nur 66,3 Proz.

Zum Schluß wurde noch ein Versuch angestellt, der zeigen sollte, ob die Katalasewirkung die gleiche ist, wenn das Ferment gleichzeitig mit dem Gift oder erst nach dessen Zerstörung zugefügt wurde. Hierbei wurde eine 0,01 n KCN-Lösung angewandt.

Versuch 11. Temperatur 18°, 752,5 mm Hg. — Gleichzeitiges Ansetzen von drei Versuchen. In jeden der drei Kolben wurden 50 ccm 3prom. H_2O_2-Lösung, 4 ccm m/30 primärer Phosphatlösung, 6 ccm m/30 sekundärer

Phosphatlösung gebracht. Zu Kolben I wurden 10 ccm, zu Kolben II und III je 8 ccm destillierten Wassers zugefügt, zu Kolben II und III auch noch je 2 ccm der 0,01 n KCN-Lösung. Die angewandte Fermentlösung war, wie gewöhnlich, 1 : 2000 verdünnt. In Abstand von 1 Minute wurden zu Kolben I und II je 10 ccm Fermentlösung zugefügt, sofort mit dem Schütteln begonnen; nach 120 Minuten wurde die gleiche Fermentmenge zu Kolben III gefügt und das Schütteln fortgesetzt. Nach 180 Minuten wurden zu KolbenIII erneut 10 ccm Fermentlösung zugefügt. p_H im Kolben I (elektrometrisch) 6,71. — Der Verlauf des Versuchs ist aus Abb. 11 ersichtlich.

Der Versuch zeigt, daß sowohl bei Kolben II, bei dem der Fermentzusatz sofort erfolgt war, als bei Kolben III, bei dem der Zusatz erst nach Zerstörung des KCN geschehen war, die O_2-Entwicklung nach 60 Minuten gleich ist, nämlich 45,2 bzw. 43,3 ccm. Die endgültige Spaltung beträgt bei Kolben II 86,8 Proz., bei Kolben III nach erneutem Fermentzusatz 100 Proz. des überhaupt abspaltbaren Sauerstoffs.

Die bisherigen Versuche haben im Einklang mit älteren Angaben gezeigt, daß eine Vergiftung der Leberkatalase mit KCN nicht zur

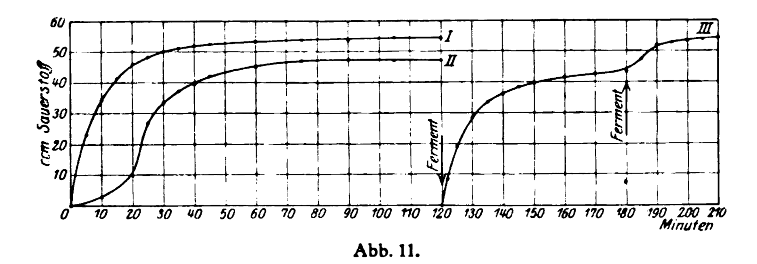


Abb. 11.

völligen Vernichtung des Ferments führt, sondern daß die Katalase sich nach einer gewissen, von der Giftkonzentration abhängigen Zeit erholt. Die Erholung erfolgt nach allmählicher Zerstörung des KCN durch das H_2O_2. Die aus der Umsetzung KCN—H_2O_2 entstehenden Produkte haben ihrerseits auf die Katalase einen (schwach) hemmenden Einfluß, der sich in der Zerstörung eines Teiles der Katalase bemerkbar macht. Die ganze Beobachtung steht in gutem Einklang mit den Ansichten von *O. Warburg* über die KCN-Vergiftung des Atmungsferments, die auf einer reversiblen Bildung komplexer Eisen-Cyanverbindungen beruht.

II.

Eine weitere Reihe von Versuchen betraf die Wirkung der *Neutralsalze* auf *Blutkatalase* (von Menschenblut), die wir nach dem Verfahren von *Tsuchihashi* gereinigt haben. Das Optimum des so gewonnenen Ferments ist breit, es erstreckt sich von p_H 8,7 bis 5,4; stärker saure Reaktionen schädigen das Ferment in irreversibler Weise. Entsprechend den Angaben von *Morgulis* entsprach die Kinetik bei 100 Proz. Spaltung

dem monomolekularen, bei einer von 60 bis 80 Proz. dem bimolekularen Reaktionsverlauf.

Untersucht wurden die Chloride, Sulfate, Nitrate von K, Na und Ca. — Bei allen diesen Versuchen betrug das Gesamtvolumen das 10fache der zugesetzten Salzlösung. Die Zusammensetzung war die folgende: Phosphatpuffer 10 ccm, destilliertes Wasser 6 bzw. 5,0 ccm, H_2O_2 (6prom. Lösung) 25,0 ccm, Fermentlösung 10,0 ccm. Die angegebenen Salzkonzentrationen sind Endkonzentrationen.

Die Versuche 12 bis 19, die nicht ausführlich wiedergegeben werden sollen, prüften die Wirkung der Chloride, Sulfate und Nitrate von K, Na und Ca bei neutraler oder der dieser naheliegenden Reaktion p_H 6,84 bis 7,14 (nur in den Versuchen mit $CaCl_2$ war die Reaktion etwas saurer: p_H 5,66 bis 6,82). Die Salzkonzentrationen betrugen 0,1 n, 0,01 n und 0,001 n. Es ergab sich, daß eine fördernde Wirkung der Kationen auch bei den schwächsten Salzkonzentrationen nicht beobachtet werden konnte, es kommt ihnen (wie dies die Versuche mit Sulfaten zeigen) auch in Konzentrationen von 0,1 n keine hemmende Wirkung zu. Von den Anionen war SO_4'' wirkungslos, Cl' hemmt die Katalasewirkung, ebenso und in noch höherem Grade NO_3'. Diese Befunde stehen mit den Angaben von *Michaelis* und *Pechstein* über ungereinigte Leberkatalase in Übereinstimmung.

Das Verhalten der Salze (der Anionen) ändert sich jedoch, wenn man nicht bei neutraler, sondern bei saurer oder alkalischer Reaktion des Mediums arbeitet[1]). Die diesbezüglichen Versuche (Anordnung wie oben) sollen ausführlicher wiedergegeben werden.

Die Pufferlösungen waren für neutrale Reaktion Phosphatgemisch, für saure Essigsäure Acetatgemisch, für alkalische Glykokoll-NaOH-Gemisch.

Versuch 20 (Tabelle XX). 0,01 n K_2SO_4. Kolben I Kontrolle ohne Salz, p_H 6,72. Kolben II Kontrolle mit Salz, p_H 6,70. Kolben III saure Reaktion mit Salz, p_H 4,02. Kolben IV alkalische Reaktion mit Salz, p_H 11,19.

Tabelle XX.

Nach	O_2 (0°, 760 mm) ccm				Proz.			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
5'	34,2	32,5	11,1	22,8	61,0	58,6	19,8	40,7
10	46,8	46,1	17,9	32,1	83,4	83,1	32,0	57,3
15	52,3	52,5	23,2	37,8	93,2	94,6	41,4	67,5
20	54,2	53,8	27,0	—	96,6	96,9	48,2	—
30	55,5	54,8	31,5	43,0	98,9	98,7	56,3	76,8
40	55,9	55,3	34,2	44,4	99,6	99,6	61,1	79,3
50	56,1	55,5	35,5	44,9	100,0	100,0	63,4	80,2

Ergebnis. Zwischen Kolben I und II keine Differenz; Kolben III zeigt stärkere Hemmung als Kolben IV.

[1]) Vgl. hierzu die Erörterungen von *Michaelis* und *Pechstein*, l. c., wie auch *Morgulis*, l. c.

Versuch 21 (Tabelle XXI). 0,01 n KCl. — Kolben I Kontrolle ohne Salz, p_H 6,91. Kolben II Kontrolle mit Salz, p_H 6,92. Kolben III saure Reaktion mit Salz, p_H 4,09. Kolben IV alkalische Reaktion mit Salz, p_H 9,89.

Tabelle XXI.

Nach	O_2 (0°, 760 mm) ccm				Proz.			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
5'	33,9	32,6	5,7	25,2	62,8	61,2	10,6	46,7
10	46,9	43,6	9,3	37,8	86,9	81,8	17,2	70,0
15	51,6	49,6	12,6	44,0	95,6	93,1	23,3	81,4
20	53,3	51,6	15,3	46,9	98,7	96,8	28,3	86,9
35	54,0	53,3	21,5	49,8	100,0	100,0	38,0	92,2
40	54,0	53,3	22,8	50,2	100,0	100,0	42,2	93,0
50	54,0	53,3	24,8	50,4	100,0	100,0	45,9	93,3

Ergebnis. Zwischen Kolben I und II keine Differenz. Kolben III zeigt starke, Kolben IV nur geringe Hemmung.

Versuch 22 (Tabelle XXII). 0,01 n KNO_3. Kolben I Kontrolle ohne Salz, p_H 7,10. Kolben II Kontrolle mit Salz, p_H 7,03. Kolben III saure Reaktion mit Salz, p_H 4,09. Kolben IV alkalische Reaktion mit Salz, p_H 10,32.

Tabelle XXII.

Nach	O_2 (0°, 760 mm) ccm				Proz.			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
5'	22,9	14,7 *)	—	15,5	40,4	25,9	—	27,3
10	48,7	21,2	0,4	23,9	85,9	37,4	—	42,3
15	53,1	27,5	0,4	33,2	93,6	48,5	—	58,6
20	55,0	31,1	0,8	36,9	97,0	54,9	—	65,1
30	56,7	35,0	1,1	40,0	100,0	61,7	1,9	70,5
40	56,7	37,0	1,1	41,1	100,0	65,3	1,9	72,5
50	56,7	38,4	1,1	41,8	100,0	67,7	1,9	73,7

*) Nach 6'.

Ergebnis. Bei Kolben III völlige, bei Kolben II starke Hemmung; bei Kolben IV geringere Hemmung. Mit zunehmender Alkalität nimmt also die hemmende Wirkung des Salzes ab. Das gleiche Ergebnis hatte der folgende Versuch.

Versuch 23. (Tabelle XXIII). 0,01 n KNO_3. Kolben I Kontrolle ohne Salz, p_H 7,17. Kolben II Kontrolle mit Salz, p_H 7,12. Kolben III saure Reaktion mit Salz, p_H 4,09. Kolben IV, alkalische Reaktion mit Salz, p_H 11,16.

Tabelle XXIII.

Nach	O_2 (0°, 760 mm) ccm				Proz.			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
5'	32,6	15,8	0,6	19,4	57,2	27,7	1,1	34,0
10	45,8	23,7	0,9	35,6	80,4	41,6	1,6	62,5
15	53,1	27,0	1,3	40,9	93,2	47,4	2,3	71,8
20	55,2	30,0	1,7	44,3	96,8	52,6	3,0	77,7

Versuch 24 (Tabelle XXIV). 0,01 n K_2SO_4, KCl, KNO_3 (Acetatpuffer). — Kolben I Kontrolle ohne Salz, p_H 4,07. Kolben II Versuch mit K_2SO_4, p_H 4,10. Kolben III Versuch mit KCl, p_H 4,07. Kolben IV Versuch mit KNO_3, p_H 4,07.

Tabelle XXIV.

Nach	O_2 (0°, 760 mm) ccm				Proz.			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
5'	13,7	10,9	5,1	0,0	24,0	19,1	8,9	0,0
10	27,5	21,5	10,7	0,2	48,2	37,7	18,8	0,0
15	34,6	27,3	14,4	0,4	60,7	47,9	25,3	0,0
20	39,7	31,4	17,6	0,6	69,6	55,1	30,9	0,0

Bei Kolben I Abschwächung gegen die Optimalkurve. Bei Kolben II bis IV zunehmende Hemmung bis zur völligen Aufhebung der Katalasewirkung bei Kolben IV. Bei saurer Reaktion wird also die hemmende Wirkung der untersuchten Anionen verstärkt.

Versuch 25 (Tabelle XXV). — 0,001 n K_2SO_4, KCl, KNO_3. — Kolben I Kontrolle ohne Salz, p_H 10,16. Kolben II Versuch mit K_2SO_4, p_H 10,11. Kolben III Versuch mit KCl, p_H 10,28. Kolben IV Versuch mit KNO_3, p_H 10,37.

Tabelle XXV.

Nach	ccm				Proz.			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
5'	14,2	18,2	19,5	18,0	24,9	31,9	34,2	31,6
10	29,0	29,2	30,0	29,8	50,9	51,2	52,6	52,3
15	35,0	34,1	34,6	34,1	61,4	59,8	60,7	59,8
20	38,2	37,1	37,3	36,7	67,0	65,1	65,4	65,1

Ergebnis. Die Fermentwirkung ist in allen vier Versuchen gleich; eine Salzwirkung ist nicht zu erkennen. Bei alkalischer Reaktion des Milieus ist also die hemmende Wirkung der untersuchten Anionen nicht mehr vorhanden.

Um diese Abhängigkeit der Salz-(Anionen-)Wirkung von der H-Ionenkonzentration sicherzustellen, wurde noch eine Reihe von Versuchen bei von 3,5 bis 8,06 steigendem p_H in der Weise angestellt, daß je vier Versuche bei gleichem p_H angesetzt wurden, von denen Kolben I als Kontrolle kein Salz, Kolben II H_2SO_4, Kolben III KCl, Kolben IV KNO_3 enthielt. Die Endkonzentration der Salze betrug stets 0,01 n.

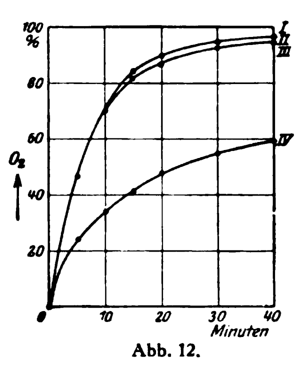


Abb. 12.

Versuch 26 (Abbildung. 12). Temperatur 19°, 763 mm Hg. m/30 Phosphatpuffer. 6 prom. H_2O_2. — 0,1 n K_2SO_4, KCl, KNO_3. Fermentverdünnung 2 : 1000. Versuchsanordnung: in jedem Kolben 10,0 ccm Puffer, 25,0 ccm H_2O_2, 10,0 ccm Ferment. In Kolben I 5,0 ccm destillierten Wassers, Kolben II 5,0 ccm K_2SO_4, Kolben III 5,0 ccm KCl, Kolben IV 5,0 ccm KNO_3. — p_H nach Abbruch des Versuchs in Kolben I 7,25, in Kolben II 7,30.

Versuch 27 (Abb. 13). 20°, 759 mm Hg. m/30 Acetatpuffer, p_H 3,34. Anordnung wie in Versuch 26. p_H in Kolben I 3,60.

Versuch 28 (Abb. 14). 20°, 762 mm Hg. Anordnung wie im Versuch 26. p_H in Kolben I 4,14.

Versuch 29 (Abb. 15). 21°, 757 mm Hg. Anordnung wie im Versuch 26. p_H in Kolben I 5,07.

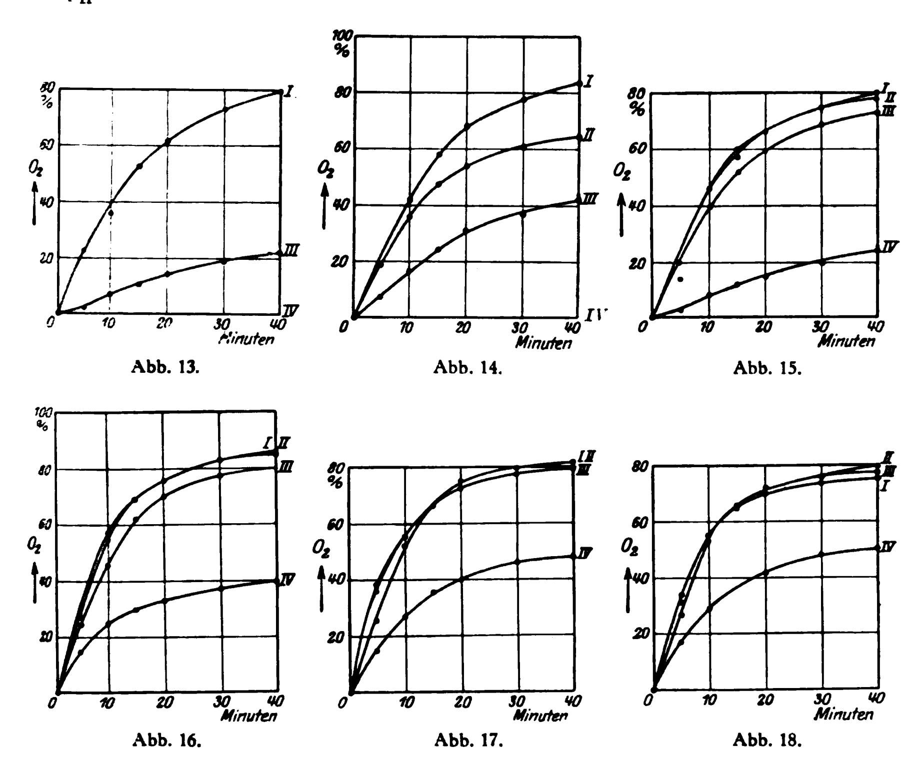


Abb. 13. Abb. 14. Abb. 15.

Abb. 16. Abb. 17. Abb. 18.

Versuch 30 (Abb. 16). 19°, 763 mm Hg. Phosphatpuffer p_H 6,11. Anordnung wie im Versuch 26. p_H in Kolben I 6,29, in Kolben II 6,26, in Kolben III 6,23.

Versuch 31 (Abb. 17). 21°, 760 mm Hg. Anordnung wie im Versuch 26. Phosphatpuffer p_H 7,11. p_H in Kolben I 7,26, in Kolben II 7,19, in Kolben III 7,30.

Versuch 32 (Abb. 18). 21°, 760 mm Hg. Anordnung wie im Versuch 26. Phosphatpuffer p_H 7,97. p_H in Kolben I 8,06, in Kolben II 7,91, in Kolben III 7,89.

Die Versuche ergeben, daß die hemmende Wirkung der geprüften Anionen am größten bei saurer Reaktion des Mediums ist; je weiter die Reaktion nach der alkalischen Seite — über den Neutralpunkt hinweg — schreitet, desto geringer wird die abschwächende Wirkung der Salze.

Zusammenfassung.

1. Die reversible Vergiftung der Katalase (aus Leber und Blut) durch KCN wurde einer eingehenderen Untersuchung unterzogen. Die Erholung des Ferments erfolgt nach einer von der Giftkonzentration abhängigen Zeit, nach Zerstörung des KCN durch das H_2O_2. Die entstehenden Oxydationsprodukte üben ihrerseits einen (schwach) hemmenden Einfluß auf die Katalase aus durch teilweise Zerstörung des Ferments.

2. Die hemmende Wirkung der Anionen SO_4'', Cl', NO_3' auf die Katalase hängt stark von der $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration des Mediums ab. Bei saurer Reaktion (p_H 3 bis 5) ist diese sehr ausgesprochen, bei alkalischer (p_H 7,3 bis 8) ist sie schwach bzw. kaum nachweisbar.

Über das optische Drehungsvermögen der Arabinsäure und der Arabinate der Alkalimetalle.

Von

M. A. Rakusin.

(Eingegangen am 12. Mai 1925.)

I. Einleitung.

An einer ganzen Reihe von Proteinen überzeugten sich *Rakusin* und seine Mitarbeiter (1), daß die Proteinate der Alkalimetalle größeres Drehungsvermögen aufweisen als die entsprechenden Proteine, und daß das Drehungsvermögen der Proteinate mit dem Atomgewicht des Metalls steigt. Spätere Versuche bewiesen die Gültigkeit dieser Gesetzmäßigkeit auch für die Nucleinsäure und deren Salze mit den Alkalimetallen (2), und endlich gelang es uns, diese Gesetzmäßigkeit auch auf Aminosäuren, namentlich Leucin (3) und Asparaginsäure (4) und deren Salze auszudehnen.

Eine theoretische Begründung für diese merkwürdige Gesetzmäßigkeit, die, wie es scheint, an Salzen zuerst studiert wird, sind wir vorläufig nicht zu finden imstande. Auch sind wir zurzeit noch nicht imstande, anzugeben, ob die erwähnte Tatsache in irgend einer Beziehung zur bekannten Regel von *Oudemans* steht, oder ob sie irgend einen Beitrag zur Hypothese von *Guye* (s. unten) liefert, über die die Debatte, wie bekannt, noch nicht abgeschlossen ist.

Allerdings schien es uns sowohl von theoretischem als von praktischem Interesse, uns zu überzeugen, ob diese Gesetzmäßigkeit auch für stickstofffreie, optisch aktive Säuren und deren Salze der Alkalimetalle Geltung hat. Als solche wählten wir fürs erste die Arabinsäure.

II. Einiges über die Zusammensetzung und Eigenschaften des Gummi arabicums.

Die verschiedenen Literaturangaben über die chemische Zusammensetzung und Eigenschaften des Gummi arabicums entsprechen nicht alle den Tatsachen. Die einzig richtige ist die, nach der das Gummi arabicum ein Gemisch der neutralen Salze des K, Mg und Ca re-

präsentiert (5), deren Gesamtmenge (Aschengehalt), wie ich mich überzeugte, 2,25 Proz. beträgt.

Das spezifische Drehungsvermögen des Gummi arabicums wird zu — 23 bis — 34^0 angegeben. Das Präparat, das mir als Ausgangsmaterial für Arabinsäure diente, wies eine spezifische Drehung von — 24,8^0 auf.

III. Das optische Verhalten der Arabinsäure.

Die Arabinsäure (Arabin, Gummisäure) wurde aus Gummi arabicum durch Bearbeitung mit Salzsäure und darauf folgende Fällung mit Alkohol gewonnen. Der weiße, mit Alkohol wohl gewaschene Niederschlag ergab nach dem Trocknen eine spezifische Drehung — 27,86^0.

Landolt (6) gibt mit Bezug auf *Scheibler* (7) einen Wert von — 98,5^0 an, und zwar für „reine Arabinsäure", aus Runkelrüben gewonnen. Bei der Lektüre der Originalabhandlung stellte es sich aber heraus, daß die von *Scheibler* 1868 dargestellte Substanz mit der Cellulosesäure (Acide cellulique) von *Frémy* identisch war, welche dieser Forscher später mit dem Namen „Metapektinsäure" bezeichnete. *Scheibler* berichtet ferner, daß diese Säure wohl linksdrehend ist, ohne jedoch einen genauen Drehungswert anzugeben. Die obige Angabe von *Landolt* ist also auf irgend ein Versehen zurückzuführen. Nun gibt aber weiter *Scheibler* an, daß seine Säure *von Alkalien* und *alkalischen Erden nicht angegriffen* wird, während Mineralsäuren sowie organische Säuren einen die *Fehling*sche Lösung reduzierenden Zucker ausscheiden. Hieraus zieht er den Schluß, daß die Metapektinsäure ein *Glucosid* ist. Er operierte also mit einer Substanz, die von der Arabinsäure im gegenwärtigen Sinne des Wortes ganz verschieden ist.

Während der Anfertigung dieser Schrift gelang es mir übrigens, eine Angabe für das Drehungsvermögen der Arabinsäure speziell aus Gummi arabicum zu finden. Es ist das die Angabe von *Béchamp* (8), nach der $[\alpha]_D = - 35$ bis $- 36^0$ ist.

IV. Das optische Verhalten der Arabinate der Alkalimetalle.

Das NH_4-Salz der Arabinsäure wurde durch Behandlung der Arabinsäurelösung mit einer wässerigen Lösung von NH_3 und Eindampfen der Lösung zur Trockne dargestellt. Behufs Darstellung der Arabinate des Li, Na und K wurde zunächst der Titer der Arabinsäure festgestellt, wonach die Salze durch Vermengen von äquivalenten Mengen der Säure und der betreffenden Alkalien und Eindampfen der Lösungen bis zur Trockne dargestellt wurden. Eine etwaige Spur von überschüssigem Alkali wurde durch Waschen mit absolutem Alkohol entfernt.

Die so dargestellten Arabinate wiesen folgende Drehungswerte auf:

Arabinate	α	l	c	$[\alpha]_D$
Li	$-0{,}3^0$	1 dm	1,1678	$-17{,}81^0$
NH_4	$-0{,}7$	1 „	2,4900	$-19{,}81$
Na	$-0{,}4$	1 „	1,2335	$-21{,}67$
K	$-0{,}3$	1 „	1,3018	$-23{,}06$

Anmerkung. Die beobachteten Drehungswerte sind in Saccharimetergraden ausgedrückt und zur Berechnung von $[\alpha]_D$ in Kreisgrade umgerechnet.

Aus den vorgeführten Daten geht hervor, daß die *Arabinate der Alkalimetalle eine geringere* $[\alpha]_D$ *aufweisen als die Arabinsäure,* und daß $[\alpha]_D$ der *Arabinate mit dem Atomgewicht des Metalls steigt.*

Dieser Schluß steht im Einklang mit der spezifischen Drehung des Gummi arabicums, welche, wie das auch zu erwarten wäre, etwas größer sein soll, als die des K-Arabinats.

Zuletzt möchte ich bemerken, daß speziell das optische Verhalten einiger Derivate von stickstofffreien Säuren schon früher von anderen Forschern studiert wurde. *Guye* (9) studierte namentlich die *Ester* der *Weinsäure* mit Methyl-, Äthyl-, Propyl- und Isobutylalkohol und fand eine der oben beschriebenen ähnliche Gesetzmäßigkeit, während *Kanonikow* (10) das Drehungsvermögen der *Tartrate* der Alkalimetalle und einer Reihe von organischen Basen in wässeriger und alkoholischer Lösung untersuchte und zu Resultaten kam, auf die hier nicht näher eingegangen werden kann.

Fräulein *Nina Scheinberg*, Cand. d. Chem. d. Univ. Odessa, sei auch an dieser Stelle mein herzlichster Dank für die wertvolle Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit ausgesprochen.

Literatur.

1) Journ. d. Russ. physiko-chem. Ges. 1915—1918. — 2) Ebendaselbst 1916, S. 97. — 3) Ebendaselbst 1917, S. 92. — 4) Ebendaselbst, S. 245 — 5) Biochem. Handlex. **2**, 3, 1911. — 6) Das opt. Drehungsverm. org. Verb. 1898, S. 542. — 7) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **1**, 58—62, 108, 1868. — 8) Biochem. Handlex. **2**, 5, 1911. — 9) *H. Jones*, Grundl. d. physik. Chem. (Russ. Aufl. 1911) 135; hierselbst eingehende Literaturangaben. (1890 —1895). — 10) Journ. d. Russ. physiko-chem. Ges. **22**, 369ff., 1891.

Über das Verhalten des Kaolins gegen wässerige Lösungen von Alkohol und einigen Salzen. Beiträge zur Kenntnis der negativen Adsorption. VIII.

Von

M. A. Rakusin und **A. N. Nesmejanow.**

(Aus dem organisch-chemischen Laboratorium der I. Universität Moskau.)

(Eingegangen am 12. Mai 1925.)

Die negative Adsorption in Lösungen von *Elektrolyten* ergibt sich als notwendige Folge der elektrolytischen Dissoziation, da Ionen nicht adsorbiert werden können. An der Adsorption als rein physikalischem Prozeß können nur ganze Molekeln teilnehmen. Diese Tatsache wurde in der ersten Mitteilung (1) bewiesen. Aber auch vom Standpunkte der bis jetzt unbestritten dastehenden *Freundlich-Gibbs*schen Theorie der Adsorption kann die Möglichkeit der negativen Adsorptionen in Lösungen sowohl von Elektrolyten als *Nichtelektrolyten* nicht angezweifelt werden, denn es handelt sich in diesen Fällen nur um eine Anwendung des *Gibbs*schen Theorems im umgekehrten Sinne. Und ungeachtet dessen muß man zugeben, daß wir noch über das Wesen der negativen Adsorption im unklaren sind. Selbst *Freundlich* (2) bezweifelt die Existenz der negativen Adsorption oder zählt sie zu den sehr selten auftretenden Erscheinungen, während unter den früheren Forschern über diese an und für sich so *einfache Erscheinung* einander widersprechende Ansichten herrschen, worüber ebenfalls in der ersten Mitteilung die Rede war.

Des weiteren ist es bemerkenswert, daß diese Erscheinung nur an wenigen *Salzen* der Alkalimetalle erforscht wurde, wobei als Adsorptionsmittel *Kohle*, Glaspulver und Kaolin angewandt wurden. Speziell an *Holzkohle* untersuchte die negative Adsorption von Alkalihaloiden neuerdings *Pickles* (3). Wir sehen also, daß ein und derselbe poröse Stoff sowohl positive als negative Adsorption hervorrufen kann, was natürlich in erster Linie von der Beschaffenheit der Oberfläche des Adsorbens abhängig ist.

Über Beobachtungen an Nichtelektrolyten sind, soweit die Literatur ausreicht, nur zwei Angaben bekannt: die eine von *Rakusin* und *Kowarski* an einer Lösung von *Rohrzucker* (1) und die andere von *Quincke* und *Wagenmann* (4) über die Einwirkung von gebranntem Ton bzw. Quarzsand auf ein Gemenge von *Alkohol* und Wasser, wobei dem Gemenge Wasser entzogen wird, so daß eine Anreicherung an Alkohol stattfindet. Diese 1856 gemachte Beobachtung wurde 1860 von *Duclaux* und 1886 von *Gerstmann* bestätigt.

Wir waren nun überzeugt, daß die merkwürdige Beobachtung von *Quincke* und *Wagenmann* ganz der von uns genauer studierten Beobachtung *Carl Ludwigs* an *Schweinsblase* und wässerigem Alkohol ähnlich ist, welch letztere wir in der sechsten Mitteilung (5) beschrieben haben. Von diesem Standpunkte ausgehend, wollten wir uns überzeugen, wie der Prozeß bei *verschiedenen Verdünnung* des Alkohols verlaufen wird. Wir erhielten aber wider Erwarten folgende Resultate:

Einwirkung von frisch geglühtem Kaolin auf wässerige Lösungen von Äthylalkohol.

$D_4^{15,5}$		Konzentration		$D_4^{15,5}$		Konzentration	
vor Ads.	nach Ads.	vor Ads.	nach Ads.	vor Ads.	nach Ads.	vor Ads.	nach Ads.
0,9971	0,9971	1,6	1,6	0,9398	0,9402	39,9	39,7
0,9922	0,9922	4,5	4,5	0,9105	0,9101	53,3	53,5
0,9872	0,9872	7,8	7,8	0,8855	0,8855	64,4	64,4
0,9741	0,9743	18,0	17,9	0,8588	0,8589	75,7	75,6
0,9585	0,9585	29,5	29,5	0,8105	0,8105	94,5	94,5
0,9538	0,9538	32,4	32,4				

Anmerkung. 1. Die Versuche wurden nach der Aufgußmethode (24 Stdn.) mit 10proz. Kaolin (vom Gewicht der Lösung) ausgeführt. 2. Die spezifischen Gewichte wurden pyknometrisch bestimmt, und die Konzentrationen nach *Fownes* berechnet.

Wir sehen somit, daß Kaolin, im Gegensatz zu Gelatine, weder in verdünnten, noch in konzentrierten Lösungen von Äthylalkohol Konzentrationserhöhung hervorruft. Es fragt sich nun, ob man hierdurch die Beobachtungen von *Quincke* und *Wagenmann* u. a. als widerlegt betrachten kann? Wir haben lange darüber nachgedacht, ohne uns diesen Widerspruch erklären zu können.

Ebenso erfolglos blieben unsere Versuche mit Kaolin und den wässerigen Lösungen folgender 17 *Salze:* NH_4Cl, $NaCl$, KCl, $CaCl_2$, $SrCl_2$, $BaCl_2$, $MgCl_2$, $AlCl_3$, $FeCl_3$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $HgCl_2$, $NiCl_2$, $MnCl_2$, $SnCl_2$, $AgNO_3$ und $CuSO_4$. Daß wir mit NaCl vor einigen Jahren zu einer negativen Adsorption kamen, haben wir in der ersten Mitteilung berichtet. Aber auch mit $CuSO_4$-Lösung (10 Proz. Kaolin, 24 Stunden) haben wir vor kurzem negative Adsorption beobachtet, wie das aus folgenden Daten erhellt:

$c = 0{,}5214$, $C = 0{,}5415$, $X = 0{,}0201$, wo c die Konzentration vor der Adsorption bedeutet, C = nach der Adsorption und X = die nach der Formel von *Rakusin* und *Gönke* (6) berechnete adsorbierte Wassermenge auf 100 g Lösung. Wir sehen somit, daß auch ein und derselbe Experimentator bei der Arbeit mit ein und demselben Adsorbens auf verschiedene Resultate kommen kann, was übrigens schon daraus folgt, daß poröse Stoffe (s. oben) sowohl positive als negative Adsorption hervorrufen können.

Von der Angabe der übrigen Zahlendaten sehen wir, um Raum zu sparen, ab.

Diese Widersprüche sowie die Widersprüche in den Angaben aller früheren Forscher, mit Ausnahme von *Herzog* und *Adler* (s. unten), scheinen in der *verschiedenen Beschaffenheit* der betreffenden Adsorbenzien ihre Erklärung zu finden. So fanden z. B. vor kurzem *Boudouard* und *Lefranc* (7), daß die *Kaoline* des Handels in ihrer Zusammensetzung stark *variieren* und bedeutende Abweichungen von der theoretischen Zusammensetzung des Kaolins $Al_2O_3 \cdot 2\,SiO_3 \cdot 2\,H_2O$ aufweisen. Daß diese Betrachtungen der eben genannten Forscher auch beim Studium der Filtrations- bzw. Adsorptionserscheinungen in der *Chamberland*-Kerze von Bedeutung sein können, versteht sich von selbst.

Was nun die Ansichten von *Herzog* und *Adler* anbetrifft, so wurde bereits in der dritten Mitteilung (8) erörtert, daß es sich dort um *scheinbare* negative Adsorption handelt. In Wirklichkeit aber findet hierbei nur ein Übergang der Gelatine in Lösung statt.

Literatur.

1) Diese Zeitschr. **180**, 282, 1922. — 2) Zeitschr. f. physik. Chem. 1907, S. 385ff. — 3) Chem. Centralbl. **1922**, I. — 4) *L. Darmstädter*, Handb. d. Gesch. d. Naturw. u. Techn. 1908, S. 567. — 5) Diese Zeitschr. **137**, 353, 1923. — 6) Ebendaselbst **132**, 82, 1922. — 7) Chem. Centralbl. **1923**, I, 228; **1923**, IV, 854. — 8) Diese Zeitschr. **137**, 341ff., 1923.

Experimentelle Untersuchungen über Gewöhnung an Alkohol bei Menschen.

Von

Klaus Hansen.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Oslo [Kristiania].)

(Eingegangen am 14. Mai 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die meisten alkohologischen Autoren nehmen an, daß beim Menschen eine Gewöhnung an den Alkohol stattfinde; sie stützen sich dabei teils auf Experimente, teils auf klinische Beobachtungen. Nach den Arbeiten zu urteilen, die auf diesem Gebiete vorliegen, scheint die Gewöhnung teils auf einer erhöhten Widerstandsfähigkeit der Körperzellen gegen den Alkohol, teils auf einer Steigerung der Fähigkeit des Organismus, sich des Alkohols durch Verbrennung zu entledigen, beruhen zu können. Vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, diese letztere Möglichkeit zu beleuchten.

Eine kräftigere Alkoholverbrennung nach Gewöhnung ist wahrscheinlich gemacht von *Hunt* (4) für *Mäuse* und *Meerschweinchen* und direkt nachgewiesen von *J. Pringsheim* (5) für *Ratten* und *Kaninchen*, und von *Völtz* und *Dietrich* (8) für *Hunde*. Der Unterschied ist indessen nicht groß; nach einer täglichen Alkoholgabe von etwa 3 g pro Kilogramm Körpergewicht während 3 Wochen, verbrannten *Pringsheims* Versuchstiere den Alkohol in etwa zwei Drittel der normalen Zeit.

Die letzte Arbeit über Gewöhnung an Alkohol wird durch *Faure* und *Loewes* (1) umfassende Versuche an Kaninchen repräsentiert. Die beiden Autoren, deren Versuche hauptsächlich den ersten 2 Stunden nach der Alkoholaufnahme gelten, finden, daß sich für diesen Zeitraum kein Unterschied im Verlauf der Konzentrationskurven bei gewöhnten und nicht gewöhnten Kaninchen nachweisen läßt, der für eine raschere Verbrennung bei den ersteren spräche; dagegen erfolgt die Resorption des Alkohols schneller bei gewöhnten Tieren.

Beim Menschen ist die Frage von *Schweisheimer* und von *Gabbe* untersucht worden, die beide Blutalkoholkurven bei Versuchspersonen von verschiedenem Gewöhnungsgrade aufgenommen haben. Da sehr bald nach der Aufnahme einer Alkoholdosis annähernd Diffusionsgleichgewicht zwischen der Alkoholkonzentration im Blute und in den Geweben eintritt, und da nichts dafür spricht, daß die Alkoholausscheidung bei Gewöhnung

steigt (7, 9, 5), so wird eine niedrigere Alkoholkonzentrationskurve im Blute bzw. ein schnelleres Verschwinden des Alkohols aus dem Blute bei gewöhnten Personen auf eine intensivere Verbrennung deuten. *Gabbe* (2) gab seinen Versuchspersonen den Alkohol intravenös in 10proz. Lösung. Sein Gedanke, die Verschiedenheiten in der Resorption dadurch auszuschalten, daß er den Alkohol direkt ins Blut injizierte, ist zweifellos richtig. Aber infolge der kleinen Alkoholmengen, die man auf diesem Wege den Versuchspersonen beibringen kann (in casu 0,3 g pro Kilogramm Körpergewicht), übersteigt der Unterschied zwischen der Alkoholkonzentration des Blutes bei gewöhnten und nicht gewöhnten Personen in *Gabbes* Versuchen im großen und ganzen nicht die Differenz zwischen den Konzentrationen bei den einzelnen Individuen innerhalb jeder der beiden Gruppen. *Gabbes* Kurven scheinen mir daher weniger beweisend für eine raschere Verbrennung als *Schweisheimers*. Dieser Autor (6) gab 12 Personen nur männlichen Geschlechts, von denen zwei Abstinenzler, vier an mäßigen Alkoholgenuß Gewöhnte und sechs Potatoren waren, 1,25 g absoluten Alkohols pro Kilogramm Körpergewicht in Form von Wein und bestimmte in Pausen den Alkoholgehalt des Blutes während der folgenden 7 bis 12 Stunden. Das Ergebnis war, daß die Abstinenzler im allgemeinen höhere Alkoholkonzentrationen und ein späteres Verschwinden des Alkohols aus dem Blut aufwiesen als die Mäßigen, und diese wiederum höhere Konzentrationen und späteres Verschwinden als die Trinker.

Ein Einwand läßt sich gegen *Schweisheimer* erheben. Er stützt sich auf einen Vergleich zwischen Versuchspersonen, deren Vergleichbarkeit nicht unbedingt gegeben ist, unter anderem, weil ein und dieselbe Alkoholdosis pro Kilogramm in Wirklichkeit für ein fettes (oder, was oft damit gleichbedeutend ist, schweres) Individuum größer ist als für ein mageres (vgl. den Verteilungskoeffizienten des Alkohols Fett/Wasser). Dafür bieten *Schweisheimers* eigene Versuche Beispiele. So zeigt Versuchsperson Nr. 10, die 99 kg wog und daher eine absolute Alkoholmenge erhielt, die beinahe 50 Proz. über der der anderen lag, obwohl es sich um einen Potator handelte, eine Alkoholkonzentration im Blut, die der bei den beiden untersuchten Abstinenzlern gefundenen entspricht.

Sichere Resultate darf man erwarten, wenn man die Alkoholverbrennung bei ein und demselben Individuum im ungewöhnten und dann im alkoholgewöhnten Zustande untersucht, also nach dem von Tierexperimenten über Gewöhnung an Gifte her wohlbekannten Prinzip. In vorliegender Arbeit ist dieser Weg gewählt worden.

Versuche dieser Art bei Menschen sind mit beträchtlicher Verantwortung verbunden. Es ist unbedingt erforderlich, daß man nur Versuchspersonen benutzt, bei denen man keinen Grund hat zu befürchten, daß sie durch die Versuche Geschmack am Alkohol bekommen. Um die Chancen für einen positiven Ausfall der Gewöhnung zu erhöhen, ist es ferner wünschenswert, als Versuchspersonen junge Individuen zu wählen, die möglichst gar nicht an Alkohol gewöhnt sind. Da sich in meinen Bekanntenkreisen keine vollständig alkoholungewohnten Personen fanden, die bereit waren, an den Versuchen teilzunehmen, wandte ich mich an eine hiesige Enthaltsamkeitsorganisation. Diese

bezeichnete mir zuvorkommenderweise zwei ihrer jüngeren enthusiastischen Mitglieder, ein männliches und ein weibliches, die bisher nie Alkohol in irgendwelcher Form genossen hatten, und die sich aus Interesse für die Alkoholfrage für die Versuche zur Verfügung stellten.

Die Rücksicht auf die Versuchspersonen bewirkte, daß die Versuchsdosis verhältnismäßig niedrig gewählt wurde: 0,5 g absoluten Alkohols pro Kilogramm Körpergewicht am Tage. An den Tagen, an denen Blutproben entnommen wurden, kamen die Versuchspersonen morgens mit nüchternem Magen ins Laboratorium und erhielten hier ein leichtes Frühstück von immer der gleichen Zusammensetzung (drei Stücke Butterbrot und eine Tasse Tee). 2 Stunden später wurde der Alkohol mit Wasser auf 10 Proz. verdünnt im Laufe von 20 Minuten eingenommen, worauf mit Zwischenräumen Blutproben zur Analyse auf Alkohol durch Punktion der Vena mediana cubiti entnommen wurden. An jedem Versuchstage wurde mindestens eine Kontrollanalyse des Blutes vor der Alkoholaufnahme gemacht. Von solchen Blutprobeserien wurden nun drei bei jeder Versuchsperson entnommen, nämlich je eine am ersten und letzten Tage der Versuchsperiode und eine an einem Tage ungefähr in der Mitte der Periode. In den dazwischen liegenden Tagen kamen die Versuchspersonen nur, um die Alkoholdosis zu trinken.

Die chemische Methode zur Alkoholbestimmung war eine Vereinfachung der anderenorts (3, 34ff.) beschriebenen. Das Blut wurde in einer Menge von ungefähr 5 g in einem tarierten Erlenmeyerkolben, der 15 ccm gesättigter Pikrinsäurelösung enthielt, aufgefangen. Der Kolben wurde mit einem Gummipfropfen verschlossen und gewogen. Dann wurde der Alkohol direkt in eine Vorlage überdestilliert, die aus Bichromatschwefelsäure mit bekanntem Bichromatgehalt bestand. Nach beendeter Destillation Verdünnung mit 100 ccm destillierten Wassers in einem Erlenmeyerkolben und Zurücktitrierung der nicht reduzierten Bichromatmenge mit Thiosulfatlösung nach Zusatz von 10 ccm 10proz. Jodkaliumlösung und Stärke als Indikator. Die in einem Blindversuch reduzierte Menge wird abgezogen. Die absolute Fehlergrenze der Methode liegt bei einigen Hundertsteln Promille.

Erste Versuchsperson.

Esther O., 20 Jahre alt, Körpergewicht etwa 52 kg, unverändert während der Versuchsperiode; in gutem Ernährungszustand. Hat als Kind an Skrofulose gelitten, ist aber jetzt gesund. Ist von Kindheit an Mitglied einer Totalenthaltsamkeitsorganisation gewesen und hat nie Alkohol in irgendwelcher Form zu sich genommen. Vater angeblich Potator. Dauer der Versuchsperiode 26 Tage. Alkoholdosis pro Tag 26 g, mit einem Tage Unterbrechung. Gesamtalkoholkonsum 650 g Alk. absol. = 12,5 g pro Kilogramm.

1. Versuchstag, 11. November 1921.

1. Blutprobe 12h 05′, Alkoholgehalt 0,06 Prom., Alkoholaufnahme 12h 50′ bis 1h 10′, 26 g Alk. absol.
2. Blutprobe 1h 45′ Alkoholgehalt 0,52 Prom.
3. „ 4 45 „ 0,15 „

Vom 12. bis einschl. 18. November täglich 26 g Alkohol, im ganzen 182 g.

2. Versuchstag, 19. November 1921.

1. Blutprobe 10h 10′, Alkoholgehalt 0,02 Prom., Alkoholaufnahme 11h 40′ bis 12h, 26 g Alk. absol.
2. Blutprobe 12h 00′ Alkoholgehalt 0,04 Prom.
3. „ 1 00 „ 0,44 „
4. „ 2 00 „ 0,37 „
5. „ 3 00 „ 0,21 „
6. „ 4 00 „ 0,05 „
7. „ 5 00 „ Spuren

Vom 20. bis einschl. 28. November täglich 26 g Alkohol, im ganzen 234 g Alk. absol.

29. November, kein Alkohol.

Vom 30. November bis einschl. 5. Dezember täglich 26 g Alkohol, im ganzen 156 g Alk. absol.

3. Versuchstag, 6. Dezember 1921.

1. Blutprobe 10h 05′ Alkoholgehalt 0,02 Prom.
2. „ 11 35 „ 0,02 „
   Alkoholaufnahme 11h 40′ bis 12h 00′, 26 g Alk. absol.
3. Blutprobe 12h 00′ Alkoholgehalt 0,09 Prom.
4. „ 1 00 „ 0,49 „
5. „ 3 00 „ 0,14 „
6. „ 4 00 „ 0,03 „
7. „ 5 00 „ 0,04 „

Erkennbare Zeichen von Berauschung bot die Versuchsperson nicht. Auch die subjektiven Zeichen waren wenig ausgesprochen; ein sicherer Unterschied zwischen dem ersten und dem letzten Alkoholtage war angeblich nicht zu spüren. Der Alkohol war der Versuchsperson bis zuletzt widerwärtig. In Abb. 1 ist der Alkoholgehalt des Blutes an den 3 Versuchstagen bei der ersten Versuchsperson graphisch wiedergegeben.

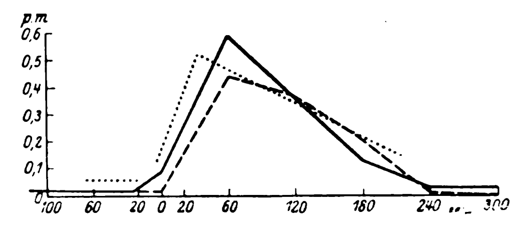


Abb. 1. Graphische Darstellung des Alkoholgehalts des Blutes bei der ersten Versuchsperson. Die Ordinate bezeichnet die Alkoholkonzentration in Promille, die Abszisse die Zeit in Minuten in positiver und negativer Richtung vom Schluß der Alkoholaufnahme an gerechnet. .... die Alkoholkurve für den ersten, ----- für den zweiten und —— für den dritten Blutprobetag.

Der Fall, den die Kurven mit steigender Gewöhnung zeigen, ist so klein, daß er keine Schlüsse zuläßt. Bei dieser Versuchsperson ist also nach Gewöhnung mit 650 g Alkohol im Laufe von 26 Tagen kein sicher nachweisbarer Unterschied in dem Verbrennungsvermögen für Alkohol eingetreten.

Zweite Versuchsperson.

K., 20 jähriger junger Mann. Körpergewicht etwa 65 kg, mager. Ist nie ernstlich krank gewesen. Von Kindheit an Mitglied des Totalenthaltsamkeitsvereins; hat nie Alkohol in irgendwelcher Form genossen. Vater Potator. Dauer der Versuchsperiode 23 Tage. Alkoholdosis pro Tag 32,5 g, mit eintägiger Unterbrechung. Gesamtalkoholkonsum 715 g Alk. absol. = 10,5 g pro Kilogramm Körpergewicht.

1. Versuchstag, 16. November 1921.

1. Blutprobe $10^h 40'$ Alkoholgehalt 0,04 Prom.
2. „ 12 10 „ 0,01 „

Alkoholaufnahme $12^h 10'$ bis $12^h 30'$, 32,5 g Alk. absol.

3. Blutprobe $12^h 30'$ Alkoholgehalt 0,28 Prom.
4. „ 2 30 „ 0,51 „
5. „ 3 30 „ 0,41 „

17. bis einschl. 30. November täglich 32,5 g Alkohol, ausgenommen am 29. November, im ganzen 422,5 g Alk. absol.

2. Versuchstag, 1. Dezember 1921.

1. Blutprobe $10^h 05'$ Alkoholgehalt 0,01 Prom.
2. „ 11 30 „ 0,01 „

Alkoholaufnahme $11^h 40'$ bis $12^h 00'$, 32,5 g Alk. absol.

3. Blutprobe $12^h 00'$ Alkoholgehalt 0,17 Prom.
4. „ 1 00 „ 0,49 „
5. „ 2 00 „ 0,36 „
6. „ 3 00 „ 0,19 „
7. „ 5 00 „ 0,02 „

Vom 2. bis einschl. 7. Dezember 32,5 g Alkohol pro Tag, im ganzen 195 g Alk. absol.

3. Versuchstag, 8. Dezember 1921.

1. Blutprobe $10^h 20'$ Alkoholgehalt 0,01 Prom.

Alkoholaufnahme $11^h 55'$ bis $12^h 15'$, 32,5 g Alk. absol.

2. Blutprobe $12^h 15'$ Alkoholgehalt 0,09 Prom.
3. „ 1 15 „ 0,25 „
4. „ 2 15 „ 0,42 „
5. „ 3 15 „ 0,12 „
6. „ 4 15 „ 0.03 „

Die Versuchsperson bot äußerlich keine erkennbaren Zeichen von Berauschung. Subjektiv gab sie Schweregefühl im Kopf und Schläfrigkeit an. An den Versuchstagen fiel sie zwischen den Blutproben oft in tiefen Schlaf. Ein Unterschied in der Wirkung zwischen erstem und letztem Versuchstage konnte nicht sicher beobachtet werden.

In Abb. 2 ist der Alkoholgehalt des Blutes bei der zweiten Versuchsperson in graphischer Form wiedergegeben.

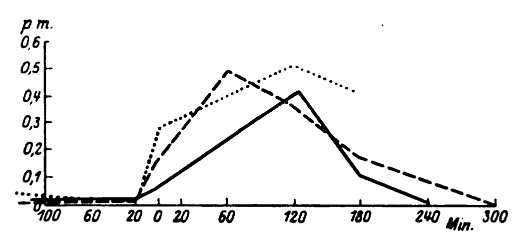


Abb. 2. **Graphische Darstellung des Alkoholgehalts des Blutes bei der zweiten Versuchsperson. Die Ordinate bezeichnet die Alkoholkonzentration in Promille, die Abszisse die Zeit in Minuten in positiver und negativer Richtung vom Schluß der Alkoholaufnahme an gerechnet.**
.... Alkoholkurve für den ersten, ----- für den zweiten und —— für den dritten Versuchstag.

Die Alkoholkurven haben bei der zweiten Versuchsperson im ganzen denselben Charakter wie bei der ersten. Bei beiden liegt die maximale Alkoholkonzentration um 0,5 Prom., und bis zur vollständigen Verbrennung der aufgenommenen Menge scheint eine Zeit von 4 bis 5 Stunden zu vergehen.

Auch bei dieser Versuchsperson zeigt der erste Teil der Kurven, der den ersten 2 Stunden nach der Alkoholaufnahme entspricht, mit steigender Gewöhnung keine eindeutigen Differenzen. Dieses Resultat stimmt also mit dem überein, was *Faure* und *Loewe* bei Kaninchen fanden, daß nämlich 2 Stunden nach der Alkoholaufnahme kein sicherer Unterschied zu beobachten war.

Wenn eine raschere Verbrennung nach Gewöhnung vorliegt, müssen wir indessen erwarten, daß sie am deutlichsten gegen das Ende der Kurven zu hervortreten wird, weil sie dann länger Zeit gehabt hat zu wirken, und weil der komplizierende Einfluß der rascheren Resorption der gewöhnten Individuen dann vorbei ist.

Betrachten wir nun den absteigenden Teil der Kurven, der dem Zeitraum 3 bis 4 Stunden nach dem Alkoholgenuß entspricht, so finden wir bei der zweiten Versuchsperson ein interessantes Verhalten: Während das Blut 3 Stunden nach dem Alkoholgenuß am ersten Tage einen Alkoholgehalt von 0,41 Prom. hatte, enthielt es am zweiten Tage 0,19 und am dritten Tage 0,12 Prom.; und 4 Stunden nach der Alkoholaufnahme war der Gehalt am zweiten Versuchstage 0,11 Prom. (Interpolation) gegen 0,03 Prom. am dritten Tage. Die Alkoholkonzentration fällt also mit steigender Gewöhnung. Da die Differenzen relativ betrachtet recht bedeutend sind, scheint der Schluß gerechtfertigt, daß bei dieser Versuchsperson eine raschere Alkoholverbrennung infolge der Gewöhnung vorliegt.

Irgend ein Grund dafür, warum die zweite Versuchsperson empfänglicher für die Gewöhnung ist, läßt sich nicht nachweisen. Wir müssen annehmen, daß individuelle Verschiedenheiten in der Empfänglichkeit für die Alkoholgewöhnung vorliegen, wie wir sie auch sonst bei Menschen und Tieren für eine Reihe anderer Formen von Gewöhnung an Gifte kennen.

Unsere Versuche führen uns daher zu dem Schluß, daß eine tägliche Alkoholdosis von 0,5 g pro Kilogramm 3 bis 4 Wochen hindurch bei einzelnen jungen, nicht gewöhnten Personen eine etwas raschere Alkoholverbrennung zu bewirken vermag, bei anderen dagegen nicht.

Bei größeren Dosen und längeren Versuchsperioden würde man wahrscheinlich die Gewöhnungsfähigkeit des Organismus vollständiger ausnutzen und dadurch das Oxydationsvermögen höher treiben. *Schweisheimers* Kurven von Potatoren, die vermutlich als optimal gewöhnte zu betrachten sind, zeigen indessen, daß das erreichbare Maximum begrenzt ist.

Die Versuche bestätigen die Befunde von *Schweisheimer* und *Gabbe* und machen die Existenz einer erhöhten Alkoholtoleranz, die auf einer kräftigeren Oxydation infolge von Gewöhnung beruht, wahrscheinlich. Sie zeigen indessen, daß die Geschwindigkeit, womit die Gewöhnung erfolgt, im Vergleich zu vielen anderen Giftstoffen (z. B. Morphin) relativ klein ist. Über eine eventuell gleichzeitig vorkommende Zellimmunität geben die Versuche keine Auskunft.

Zusammenfassung.

In den beschriebenen Versuchen, die sich mit dem Verhalten der Alkoholverbrennung beim Menschen bei Gewöhnung befassen, erhielten zwei 20jährige Versuchspersonen, die bis dahin nie Alkohol in irgendwelcher Form genossen hatten, 3 bis 4 Wochen lang täglich 0,5 g absoluten Alkohols pro Kilogramm Körpergewicht. An bestimmten Tagen wurden von Zeit zu Zeit Blutproben zur Bestimmung des Alkoholgehalts des Blutes entnommen. Während die Alkoholkurve des Blutes sich bei der einen Versuchsperson konstant hielt, sank sie bei der anderen im Laufe der Versuchszeit etwas, was auf eine gesteigerte Alkoholverbrennung infolge von Gewöhnung bezogen wird.

Literatur.

1) *W. Faure* und *S. Loewe*, diese Zeitschr. **148**, 47, 1923. — 2) *E. Gabbe*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **122**, 81, 1917. — 3) *K. Hansen*, Untersuchungen über den Einfluß des Alkohols auf die Sinnestätigkeit bei bestimmten Alkoholkonzentrationen im Organismus. Heidelberg 1924. — 4) *R. Hunt*, Public Health- and Marine Hospital Service of the United States Hygienic Laboratory, Bulletin 33, Washington 1907. — 5) *J. Pringsheim*, diese Zeitschrift **12**, 143, 1908; Inaugural-Diss. Breslau 1908. — 6) *W. Schweisheimer*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **109**, 271, 1913; Inaugural-Diss. München-Leipzig 1913. — 7) *W. Völtz* und *Baudrexel*, Pflügers Arch. **138**, 85, 1911. — 8) *W. Völtz* und *W. Dietrich*, diese Zeitschr. **68**, 118, 1915. — 9) *W. Völtz* und *J. Paechtner*, ebendaselbst **52**, 73, 1913.

Über die Wirkung des Santonins auf den Blutzucker.

Von

A. Stasiak.

(Aus dem physiologischen Institut der k. ungar. Péter-Pázmány-Universität Budapest.)

(Eingegangen am 16. Mai 1925.)

Das *Le Prince*sche pharmazeutische Laboratorium in Paris empfiehlt gegen Diabetes mellitus die santoninhaltigen Pillen des Dr. *Séjournet*. Nach seinen Anzeigen soll das Santonin alle Symptome des Diabetes, hauptsächlich die Glycosurie, günstig beeinflussen. Santonin als Antidiabeticum ist uns nicht bekannt, denn für gewöhnlich wird dasselbe nur als Anthelminthicum angewandt, und auch da mit besonderer Berücksichtigung seiner unangenehmen Nebenerscheinungen.

Die die Pharmakologie des Santonins betreffenden bisherigen Tierversuche ergeben, daß Santonin ein krampferregendes Gift ist, welches seine Wirkung auf die motorischen Rindenzentren ausüben soll; es verursacht Senkung der Körpertemperatur. Bradycardie, Pupillenverengung. Ob es auf den diabetischen Stoffwechsel des Menschen irgend einen Einfluß ausübt, untersuchte *Walterhöfer*[1]), indem er die erwähnten Dr. *Séjournet*schen Pillen verwendete. Er verabreichte dieselben längere Zeit Diabetikern, sowie auch kristallisiertes Natrium santoninicum in Dosen von 0,02 g. Er konnte aber keine Beeinflussung weder der Glykosurie, noch der Acetonurie beobachten. Nebenerscheinungen sah er keine auftreten, trotz der oft wochenlangen Darreichung des Santonins. Blutzuckerbestimmungen unternahm er nicht.

Sonstige in dieser Richtung ausgeführte Versuche mit Santonin fand ich in der Literatur nicht verzeichnet. Darum dünkte es mir von Interesse, die Wirkung des Santonins auf den Kohlenhydratstoffwechsel bzw. auf den Blutzucker normaler Tiere zu untersuchen.

Als Versuchstiere wählte ich Kaninchen. Das Santonin wurde in wässeriger, später in öliger Suspension mit der Schlundsonde den Tieren nach 10- bis 15stündigem Hungern zugeführt. Im Verlaufe des ganzen Versuchs bekamen die Tiere des öfteren, gewöhnlich drei- bis viermal

---

[1]) *Walterhöfer*, Berl. klin. Wochenschr. 1911, S. 421.

0,30 bis 0,40 g Santonin. Anfangs gebrauchte ich die *Séjournet*schen Pillen[1]) (à 0,02 g Santonin), später wandte ich Natrium santon. cryst. an. Die Blutentnahme geschah aus der Marginalvene des Ohres, der Zucker wurde darin nach der *Bang*schen Mikromethode in der *Ernst Weisz*schen Modifikation bestimmt. Ein Teil der Zuckerbestimmungen wurde von Herrn stud. med. *Láng* ausgeführt.

Bei den ersten Versuchen wurde der Blutzucker in 1½- bis 2stündigen Zeiträumen nach der Darreichung des Santonins untersucht. Doch, da die so erhaltenen Werte keine Abweichung von den normalen, täglichen Blutzuckerschwankungen zeigten, wurden im weiteren die stündlichen Untersuchungen weggelassen und bloß täglich ein- bis zweimal durchgeführt. Während der Dauer je eines Versuchs bekamen die Tiere des öfteren 0,30 bis 0,40 g Santonin, so daß im Verlauf der Versuche je ein Tier 0,20 bis 0,35 g Santonin pro Kilogramm Körpergewicht erhielt.

Bei dem ersten Versuchstiere (Tabelle I) konnte man durch längere Zeit gar keine Veränderungen bemerken. 14 Tage nach der ersten Santoningabe fiel mir die Niedergeschlagenheit des Tieres auf, trotz guten Appetits magerte es stark ab; die Blutzuckerwerte waren normal. Nach einigen Tagen trat in allen Muskeln auffallende Schlaffheit auf, im Zusammenhang damit (21. November, also am 22. Tage nach der Santoninzufuhr) fiel der Blutzucker auf 0,069 Proz. Am nächsten Tage früh betrug er 0,059 Proz.; den ganzen Tag saß das Tier fast regungslos im Käfig mit großer allgemeiner Muskelschlaffheit. Denselben Tag um 1 Uhr 50 Minuten, als wir das Tier zur Blutentnahme herausnahmen, streckte es sich plötzlich dahin mit gänzlich schlaffen Muskeln, an den Extremitäten traten Krämpfe auf, die Körpertemperatur sank; der Blutzucker war 0,026 Proz. Da wurden dem Tiere 2 g Dextrose subkutan injiziert, und es wurde in einen Brutschrank von 37° C gelegt. Nach kaum 10 Minuten kam das Tier so weit zu sich, daß es sich aufsetzte und fraß, obzwar das Kauen nur mühsam ging. Nach etwa 1½ Stunden war der Blutzucker 0,138 Proz., gegen Abend sank er auf 0,094 Proz. Am nächsten Tage fiel er weiter auf 0,063 Proz., das Tier zeigte ganz ähnliche Erscheinungen wie tags zuvor, welche nach Dextroseinjektion sich immer schnell besserten. Schließlich führte dieser Zustand am nächsten Tage zum Tode des Tieres.

Das zweite Kaninchen (Tabelle II) verhielt sich ganz ähnlich. In den ersten Tagen schien das Tier ganz normal, mit normalem Blutzucker. Am zehnten Tage des Versuchs war wieder die Niedergeschlagenheit des Tieres auffallend; dabei gebrauchte es die hinteren Extremitäten

---

[1]) Die Pillen des Dr. *Séjournet* wurden mir von der Vertretung des *Le Prince*schen Laboratoriums: „Panacea" Pharmakol.-chem. A.-G., Budapest, gütigst zur Verfügung gestellt.

ungeschickt, dieselben schienen etwas paretisch. Diese Parese wurde immer ausgesprochener, und allmählich entwickelte sich die schon aus dem vorigen Versuch bekannte Schlaffheit. Am 16. Tage des Versuchs (20. November) sank der bis dahin normale Blutzucker auf 0,021 Proz.; in den Mittagsstunden streckte sich das Tier, an den ganz schlaffen Extremitäten traten zeitweise Zuckungen auf, starke Senkung der Körpertemperatur. Nach 2 g Dextrose subkutan erholt sich das Tier im Brutschrank ein wenig, die Parese der hinteren Extremitäten schwindet nach einer Zeit und tritt eher an den vorderen auf; der Blutzucker beträgt 0,026 Proz. Das Tier bekommt von neuem 1 g Dextrose subkutan, worauf es, beiläufig nach einer halben Stunde, sich im Brutschrank aufsetzt und frißt. Nach weiteren 1½ Stunden ist der Blutzucker 0,186 Proz. Anderentags gelang die Blutentnahme kein einziges Mal; auch nach Durchschneidung der Marginalvene trat kaum eine merkliche Blutung auf. Das Tier war den ganzen Tag über in einem moribunden Zustande; am Nachmittag traten wieder dieselben Symptome wie tags zuvor auf, von welchen das Tier sich nach 2 g Dextrose im Brutschrank bald erholt. Am nächsten Tage früh fanden wir es im Käfig dahingestreckt: schwere Dyspnoe, arhythmischer, kaum fühlbarer Herzschlag, große Cyanose; nach 2 g Dextrose subkutan erholt es sich im Brutschrank binnen einer Viertelstunde. Die Blutentnahme gelang erst spät nachmittags, der Blutzucker war 0,049 Proz. Die Krämpfe an den schlaffen Extremitäten sowie die starke Senkung der Körpertemperatur wiederholen sich; 2 g Dextrose bringen wieder Besserung. Am nächsten Tage früh Exitus.

Das dritte Kaninchen (Tabelle III) zeigte ganz ähnliche Erscheinungen, doch mit dem Unterschiede, daß sich nie Hypoglykämie einstellte, sondern im Gegenteil, während des Verlaufs des ganzen Versuchs waren die Blutzuckerwerte eher etwas höher, einigemal trat ausgesprochene Hyperglykämie (0,235 Proz) auf. Die Dauer des Versuchs bei diesem Tiere war auch länger als bei den übrigen Tieren. Der Versuch begann am 18. November, die Niedergeschlagenheit und Muskelhypotonie begann nach etwa 3 Wochen, am 12. Dezember, später gesellte sich auch die Parese der hinteren Extremitäten dazu. Am 5. Januar war der Blutzucker 0,250 Proz., die Hyperglykämie besteht auch die nächsten Tage, am 8. Januar ist er 0,180 Proz., das Tier streckt sich dahin, Krämpfe; trotz der Dextroseinjektion tritt schnell Exitus ein.

Die übrigen Versuchstiere, das vierte, fünfte und sechste Kaninchen, zeigen ähnliche Erscheinungen wie die ersten zwei Tiere; der Blutzucker ist niedrig. Die Symptome treten bei Kaninchen IV und V des öfteren auf, Dextroseinjektion bringt immer schnelle Besserung, doch schließlich führt der Zustand zum Tode des Versuchstieres. Bei Kaninchen IV tritt der Tod am 29. Tage, bei Kaninchen V am 32. Tage

des Versuchs ein. Bei Kaninchen VI traten des öfteren niedrige Blutzuckerwerte auf; zu den bekannten Symptomen kam es hier nicht, da das Tier äußerer Gründe wegen während des Versuchs durch Nackenschlag getötet wurde.

Sämtliche Tiere kamen zur Sektion; im allgemeinen ergaben alle Tiere ähnliche Befunde. Die auffallendsten Veränderungen zeigte immer die Leber, außerdem die Nieren und Nebennieren. Die Leber aller Tiere zeigte mehrere punktförmige, bis stecknadelkopfgroße, grauweiße Stellen; in den Nebennieren fanden sich bei einigen Tieren grauweiße Punkte, am Querschnitt der Nieren punktförmige Blutungen.

Die histologischen Untersuchungen, welche von Herrn *D. Hattyassy* in unserem Institut durchgeführt wurden, gaben im allgemeinen folgende Resultate: Die Leber aller Tiere zeigte mehr oder weniger ausgebreitete, frische sowie ältere Blutungen, die reguläre Anordnung der Leberzellen ist an vielen Plätzen gelöst, die Zellgrenzen sind verschwommen, Protoplasmazerfall, schlechte Kernfärbung, an einzelnen Stellen fehlt letztere gänzlich. Die Nieren zeigten auch kleinere Blutungen und geringe parenchymatöse Degeneration der Zellen.

Es stellt sich nun die Frage, wie die bisher beschriebenen Veränderungen zustande gekommen sind? Die chemische Zusammensetzung des Santonins gibt uns kaum Anhaltspunkte. Die Stoffe von bekannter Zusammensetzung, die auch Hypoglykämie verursachen, wie z. B. das Hydrazin oder das Guanidin, und die auch als Lebergifte gelten, enthalten die NH_2-Gruppe; ihre Toxizität ist vielleicht auf diese zurückzuführen. Hingegen ist Santonin eine stickstofffreie Verbindung, ein Naphthalinderivat, das Anhydrid der Santoninsäure. Es enthält CH_3-Gruppen, zwei Ketongruppen. Die vorher erwähnten Gifte [das Hydrazin untersuchte *Underhill*[1]), das Guanidin *Watanabe*[2])] erzeugen wohl Hypoglykämie, ohne aber daß dieselbe je mit solchen Erscheinungen einhergegangen wäre, welche man mit dem Namen des „hypoglykämischen Symptomenkomplexes“ hätte bezeichnen können. Letzteren kennen wir ja nur seit den Untersuchungen mit Insulin. *Underhill* versuchte auch die Anwendung von Dextrose bei der durch Hydrazin verursachten Hypoglykämie, doch dieselbe brachte nicht nur keine Besserung, sondern führte immer zum raschen Tode des Versuchstieres.

Um die Wirkung des Santonins zu untersuchen, stellten verschiedene Autoren Versuche an, wenn auch aus ganz verschiedenen Gesichtspunkten. Der Kürze halber seien nur die Namen erwähnt: *Jaffé*[3]), *Turtschaninow*[4]),

[1]) *Underhill,* Journ. of biol. Chem. **10**, 159, 1911.
[2]) *Watanabe,* ebendaselbst **33**, 253, 1918.
[3]) *Jaffé,* Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**, 538, 1897.
[4]) *Turtschaninow,* Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **34**, 208, 1894.

Wedekind[1]), *Harnack* und *Hochheim*[2]); letztere teilen auch Sektionsbefunde mit: mäßig injizierte Nieren, punktartige, bis stecknadelkopfgroße, gelbgraue Stellen an der Leber. Bei all diesen Autoren lassen sich die beobachteten Erscheinungen im folgenden zusammenfassen: Hypertonie, epileptiforme Krämpfe, meistens Sinken der Körpertemperatur. Die angewandte Menge des Santonins betrug immer einige Gramm.

In meinen Versuchen betrug die ganze Santoninmenge höchstens 1 g, dieselbe wurde in kleinen Dosen des öfteren dem Tiere dargereicht, und es traten folgende Erscheinungen auf: Hypoglykämie, Hypotonie, Paresen, in Anfällen auftretende Krämpfe an den Extremitäten, hochgradige Senkung der Körpertemperatur. Von all diesen Symptomen erholt sich das Tier sehr schnell nach subkutaner Injektion von Dextrose, doch die Hypotonie und geringe Paresen bleiben zurück.

Da alle diese Erscheinungen, mit Ausnahme eines Falles (Kaninchen III), an Hypoglykämie anschließend auftreten, so stehen wir eigentlich einem „hypoglykämischen Symptomenkomplex" gegenüber, der sich aber wesentlich unterscheidet von dem, welcher nach Insulin beobachtet ist. Nach Insulin treten auch Krämpfe auf, doch sind diese tonisch-klonischer Art, die Muskeln sind hypertonisch, oft ist eine fast den Strychninvergiftungen ähnliche Reflexübererregbarkeit zu beobachten. Gemeinsam ist beiden verschiedenen Erscheinungskomplexen, daß nach Dextroseinjektion die Tiere sich sehr schnell erholen.

Eine ausreichende Erklärung des durch Insulin verursachten hypoglykämischen Symptomenkomplexes können wir bis jetzt noch nicht geben. Auf eine nähere Darstellung der diesbezüglichen Versuche muß hier verzichtet werden; so viel muß wohl zugegeben werden, daß alle diese Symptome nicht allein auf die Hypoglykämie zurückzuführen sind, sondern daß dieselben neben der Hypoglykämie mit bestehen und vielleicht auf ein direkt das Nervensystem befallendes Agens zurückzuführen wären. Diese Annahme scheint meines Erachtens auch das zu untersützen, daß Hypoglykämien auch vordem beobachtet wurden (Hydrazin, Guanidin), ohne daß sich zu denselben der charakteristische „hypoglykämische Symptomenkomplex" gesellt hätte.

Können wir nun die durch Santonin verursachten Erscheinungen irgendwie erklären? Mit Ausnahme eines Falles entwickelte sich immer Hypoglykämie; außerdem konnten wir in jedem Falle die degenerativen Veränderungen des Leberparenchyms beobachten. So ist es sehr wahrscheinlich, daß im Zusammenhang mit letzterem Funktionsstörungen der Leber zustande kamen. Da könnte man wohl annehmen, daß die Funktionsstörung der Leber es ist, welche die Hypoglykämie verursacht;

---

[1]) *Wedekind*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**, 240, 1904/05.

[2]) *Harnack* und *Hochheim*, Centralbl. f. klin. Med. **25**, 16, 1894.

doch verursacht dieselbe nicht nur die Hypoglykämie, sondern diese Funktionsstörung spielt vielleicht auch eine Rolle im Zustandebringen all der Erscheinungen, welche in allen Fällen zu beobachten waren: Hypotonie, Krämpfe, Senkung der Körpertemperatur usw. Die zeitweise Besserung der Symptome nach Dextrosedarreichung spricht nicht gegen diese Annahme, da ja die Besserung nur so lange besteht, als Dextrose im Körper zugegen ist und vielleicht die Ernährung der Zellen begünstigt.

Diese meine Auffassung scheinen ganz andersartige Versuche anderer Autoren zu unterstützen. Ich denke in erster Reihe an die zahlreichen Versuche von *Mann* und *Magath*[1]), die bei hepatektomierten Hunden auffallend ähnliche Erscheinungen beobachten konnten, wie ich an meinen Versuchstieren. Die genannten Autoren beobachteten nämlich einige Stunden nach der Leberexstirpation: 1. Muskelschwäche, Hypotonie, Areflexie; 2. später kehren die Reflexe zurück, es treten Muskelzuckungen und Krämpfe auf. Neben der Hypotonie kommt es zur starken Senkung des Blutzuckers, 0,06 bis 0,04 Proz., und Senkung der Körpertemperatur. Diese Erscheinungen bessern sich schnell, wenn das Tier in den Brutschrank von 37° gebracht und ihm Dextrose subkutan oder intravenös zugeführt wird. Die Symptome können sich wiederholt nach Dextrosezufuhr zurückbilden, führen aber schließlich doch zum Tode des Tieres. In einzelnen Fällen konnten die Autoren statt Hypo-, Hyperglykämie beobachten; in diesen Fällen hilft Dextrose nicht, das Tier geht im plötzlich auftretenden Koma zugrunde.

Die Exstirpation der Leber, d. h. der gänzliche Ausfall der Leberfunktion, hat ganz ähnliche Folgen wie die weitgehende Zerstörung des Leberparenchyms. Es ist also wahrscheinlich, daß im Zusammenhang mit der Funktionsstörung der Leber Hypoglykämie und die Erscheinungen von seiten des Nervensystems nebeneinander auftreten. Daß letztere infolge von Leberfunktionsstörungen auftreten können, scheinen auch Versuche von *Kirschbaum*[2]) zu bezeugen. Dieser Autor schaltete die Funktion der Leber aus, einesteils durch Unterbindung der A. hepatica oder des Choledochus, anderenteils durch Phosphor- oder Guanidinvergiftung. In solchen Fällen fand er degenerative Veränderungen im Großhirn, besonders an der Rinde und dem Corpus striatum. Die in meinen Versuchen beobachteten Erscheinungen können daher vielleicht dahin erklärt werden, daß Santonin eine Störung in der Funktion der Leber hervorruft, welch letztere die Hypoglykämie und alle übrigen Erscheinungen zur Folge hat.

Ich bin mir wohl bewußt, daß meine bisherigen Untersuchungen noch nicht das Recht geben, mit völliger Sicherheit neben einer Funktionsstörung der Leber Stellung zu nehmen, da ich ja nur den Zuckergehalt des Blutes untersuchte, hingegen nähere Anhaltspunkte nur

---

[1]) *Mann* und *Magath*, Ergebn. d. Physiol. **23**, 222, 1924.

[2]) *Kirschbaum*, Zeitschr. f. Nervenheilkunde **77**, 251, 1923.

andere charakteristische Veränderungen im Chemismus des Blutes (Harnsäure, Aminosäuren, Reststickstoff usw.) geben können. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung möchte ich mir vorbehalten.

Zusammenfassung.

1. Wird Kaninchen wiederholt Natrium santoninicum cryst. in Dosen von 0,20 bis 0,40 g per os zugeführt, so treten charakteristische Folgen auf: Hypoglykämie (mit Ausnahme eines Falles unter sechs Versuchstieren, wo Hyperglykämie auftrat), Hypotonie, geringe Paresen der hinteren Extremitäten. Anfallsweise führt die Hypotonie zum gänzlichen Dahinstrecken des Tieres mit klonischen Krämpfen an den Extremitäten, Senkung der Körpertemperatur. Von allen diesen Symptomen erholen sich die Tiere schnell, wenn man sie in den Brutschrank bringt und ihnen Dextrose subkutan zuführt. Doch schließlich führt der Zustand zum Tode des Versuchstieres.

2. Die histologischen Untersuchungen zeigen degenerative Veränderungen in der Leber der Versuchstiere.

3. Die beobachteten Erscheinungen sind wahrscheinlich auf eine durch das Santonin verursachte Funktionsstörung der Leber zurückzuführen, welch letztere die Hypoglykämie und die Erscheinungen von seiten des Nervensystems nebeneinander zur Folge hat.

Versuchsprotokolle[1]).

Tabelle I.

I. Kaninchen, Körpergewicht 1490 g.

Datum	Blutzucker Proz.	Bemerkungen
31. X.	0,101	Nach der Blutentnahme eine Séjournetpille per os
1. XI.	0,120	Zwei Pillen per os
4. XI.	0,112	
19. XI.	0,096	0,30 g Natrium santoninicum cryst. in Öl gelöst per os
21. XI.	0,069	Hypotonie
22. XI.		Um 1h50′ streckt sich das Tier dahin. Krämpfe an den Extremitäten, Senkung der Körpertemperatur
9h45′ a	0,059	
1h55′ p	0,026	2 g Dextrose subkutan injiziert, das Tier kommt in einen Brutschrank von 37° C; schnelle Erholung, um 2h5′ setzt sich das Tier bereits auf und frißt
3h30′	0,138	
4h30′	0,094	
23. XI.	0,063	Die gestrigen Erscheinungen wiederholen sich tagsüber mehrmals; Dextrose bringt immer schnelle Erholung, doch ist das Tier in den krampffreien Perioden äußerst apathisch, auffallende Hypotonie
24. XI.		Früh Exitus

[1]) Wegen Raumersparnis muß ich von der Wiedergabe sämtlicher Versuchsprotokolle abstehen und will nur einige davon mitteilen.

Sektionsbefund: Leber von normaler Größe, livide Verfärbung; an der Oberfläche der Leber finden sich zahlreiche, bis stecknadelkopfgroße, graugelbe Punkte. An der Oberfläche der Lungen zahlreiche Blutungen. Prallgefüllte Blase; der Urin darin ist zuckerfrei, zeigt minimale Spuren von Eiweiß; Sediment normal. *Histologischer Befund:* Leber: viele ältere sowie frischere Blutungen; weite Gallenwege; auffallende Atrophie der Leberzellen mit schlechter, oft fast gänzlich fehlender Kernfärbung, beginnender Zerfall des Protoplasmas. Glykogenfärbung nach *Best*: negativ. Pankreas: normal.

Tabelle II.

II. Kaninchen, Körpergewicht 2050 g.

Datum	Blutzucker Proz.	Bemerkungen
4. XI.	0,147	Nach der Blutentnahme sechs Séjournetpillen à 0,02 g Santonin per os
5. XI.	0,117	Sechs Pillen
6. XI.	0,107	Acht Pillen
12. XI.	0,109	
13. XI.	0,112	0,04 g Na santon. cryst. in Wasser gelöst per os
14. XI.	0,110	0,08 g Na santon. cryst. in Wasser gelöst per os
20. XI.	0,021	Körpergewicht 1400 g
12h45′		Um 1h20′ streckt sich das Tier dahin, Krämpfe, große Hypotonie, Parese der hinteren Extremitäten, Senkung der Körpertemperatur. 1h45′ 2 g Dextrose subkutan, Brutschrank
2h	0,026	2h20′ setzt sich das Tier auf und frißt. Die Parese ist von den hinteren Extremitäten gewichen und zeigt sich jetzt eher an den vorderen. 1 g Dextrose subkutan.
3h45′	0,186	
21. XI.		Blutentnahme gelingt nicht, trotz der Durchschneidung der Marginalvene kaum merkliche Blutung. Nachmittags 4 Uhr streckt sich das Tier dahin, Krämpfe. 2 g Dextrose subkutan, Brutschrank, Besserung
22. XI.		Früh finden wir das Tier dahingestreckt, große Dyspnoe und Cyanose, kaum fühlbarer Herzschlag. 9h15′ 2 g Dextrose subkutan und Brutschrank. Blutentnahme gelingt nicht. 9h30′ setzt sich das Tier auf
5h30′p	0,049	Wiederholung der Symptome; 2 g Dextrose subkutan. Besserung
23. XI.		Früh Exitus

Sektionsbefund: Leber von normaler Größe, livide Färbung; an der Oberfläche mehrere gelbgraue Punkte und sternartige graugelbe Verfärbungen. Prallgefüllte Blase. Pankreas normal. Das Zentralnervensystem zeigt makroskopisch keine Veränderungen. *Histologischer Befund:* Leber: viele Blutungen, die reguläre Anordnung der Zellen ist nicht zu erkennen, die Zellgrenzen sind verschwommen; keine oder nur sehr geringe Kernfärbung. Glykogen: negativ. Pankreas: normal.

Tabelle III.

III. Kaninchen, Körpergewicht 1900 g.

Datum	Blutzucker Proz.	Bemerkungen
18. XI.	0,112	Nach der Blutentnahme 0,07 g Na santon. cryst. in Öl gelöst per os
21. XI.	0,116	
22. XI.	0,094	
24. XI.	0,134	
25. XI.	0,156	0,16 g Na santon. cryst. in Öl gelöst per os
26. XI.	0,148	
6h p	0,201	
27. XI.	0,120	
29. XI.	0,152	
1. XII.	0,136	
2. XII.	0,132	
3. XII.	0,131	
5. XII.	0,143	
10. XII.	0,158	0,30 g Na santon. cryst. per os
11. XII.	0,137	
12. XII.	0,102	
13. XII.	0,235	Hypotonie, Apathie
15. XII.	0,123	Status idem
17. XII.	0,167	Hypotonie; Parese der hinteren Extremitäten
19. XII.	0,122	Vom 19. XII. bis 5. I. Status idem
5. I.	0,250	Große Hypotonie, gänzliche Apathie
6. I.	0,223	Große Hypotonie, das Tier sitzt regungslos, apathisch im Käfig
7. I.	0,156	Status idem
8. I.	0,180	Einige geringe Zuckungen an den Extremitäten; während der Dextroseinjektion Exitus

Sektionsbefund: Livide Leber mit zahlreichen graugelben kleinen Flecken und Blutungen. Pankreas normal. Pleurale Blutungen. Prallgefüllte Blase. Urin: Zucker 0; Albumen: Spuren; Sediment: normal. *Histologischer Befund:* Kleinere diffuse Blutungen; verschwommene Zellgrenzen, Zerfall des Protoplasmas, fehlende Kernfärbung. Kein Glykogen. Pankreas: normal.

Über Milchsäurebildung beim Wachstum.

Von

Otto Warburg (Berlin-Dahlem).

(Eingegangen am 16. Mai 1925.)

I. Historisches über Glykolyse.

In den „Leçons sur le Diabète" schreibt *Claude Bernard*[1]):

„Ce ferment lactique se rencontre dans le sang, dans les muscles, dans le foie lui-meme, car j'ai constaté que le muscle et divers tissus ne deviennent acides apres la mort qu'autant qu'ils renferment du sucre ou de la matiere glykogène qui subit tres rapidement une fermentation lactique."

Hiernach besteht kein Zweifel, daß der Vorgang, den wir heute als Glykolyse[2]) bezeichnen, *Claude Bernard* bekannt war, womit nicht gesagt sein soll, daß wir ihm allein die grundlegenden Entdeckungen auf dem Gebiete verdanken. *Berzelius* und *Liebig* wird man in einer historischen Darstellung des Milchsäureproblems immer nennen.

In der Folge hat sich das Interesse im wesentlichen der Glykolyse im Muskel zugewandt, und es gibt wohl kein physiologisches Institut, das nicht irgend einen Beitrag zur Frage der Milchsäurebildung im Muskel geliefert hätte. *Fletcher* und *Hopkins*[3]) haben bewiesen, daß der arbeitende Muskel mehr Milchsäure bildet als der ruhende, *Meyerhof*[4]) und *Hill*[4]), daß die Glykolyse die arbeitliefernde chemische Reaktion des Muskels ist.

Wertvolle Arbeiten über die Glykolyse in anderen Geweben verdanken wir *Slosse*[5]), *Levene* und *Meyer*[6]) und *Embden*[7]). Die Beziehung

---

[1]) Paris 1877, S. 328.

[2]) Das Wort Glykolyse stammt von *Lépine*. Doch versteht *Lépine* unter Glykolyse *jedes* Verschwinden von Zucker, sei es durch Oxydation, sei es durch Spaltung, während *wir* ausschließlich die Spaltung von Kohlehydrat zu Milchsäure als Glykolyse bezeichnen.

[3]) *W. M. Fletcher* and *F. G. Hopkins*, Journ. of Physiol. **35**, 247, 1906/07.

[4]) *A. V. Hill* und *O. Meyerhof*, Ergebn. d. Physiol. **22**, 299, 1923.

[5]) *A. Slosse*, Arch. Intern. de Physiol. **11**, 154, 1911.

[6]) *P. A. Levene* und *G. M. Meyer*, Journ. of biol. Chem. **11**, 361, 1912.

[7]) *G. Embden* und Mitarbeiter, diese Zeitschr. **45**, 1ff., 1912.

der Milchsäurebildung zum Wachstum ist in diesem Institut gefunden, vielleicht aber schon von *Claude Bernard* geahnt worden, als er schrieb[1]): „J'ai reconnu autrefois cette fermentation lactique de la matiere glykogène, d'abord dans les muscles du foetus, ou elle presente son summum d'intensité; je l'ai constaté plus tard chez l'homme et les animaux adultes."

II. Isolierung der von Tumorgewebe gebildeten Milchsäure als Zinklactat.

In früheren Arbeiten wurde die Milchsäure, die Tumorschnitte in Ringerlösung bilden, aus der Ringerlösung ausgeäthert und als Aldehyd nach *v. Fürth-Charnass* bestimmt. An dieser Stelle beschreibe ich die Isolierung der Milchsäure als Zinklactat.

Als Versuchsmaterial diente das *Jensen*sche Rattensarkom, den Ausgangstumor verdanke ich Dr. *W. Cramer* vom Imperial Cancer Institute in London. Aus vier frischen Tumoren wurden so viel dünne Schnitte hergestellt, daß das Gesamttrockengewicht 2,7 g betrug. Die frischen Schnitte wurden in 1 Liter Ringerlösung eingetragen, die in bezug auf Bicarbonat $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ molar war und 3 g Glucose pro Liter enthielt. Der Kolben mit den Schnitten und der Ringerlösung wurde in einen auf 38° einstehenden Thermostaten versenkt, und ein Strom von 5 Proz. Kohlensäure in Stickstoff so schnell durchgeleitet, daß die Schnitte in Bewegung waren. Nach 2 Stunden wurde der Versuch unterbrochen, und die Milchsäure nach der Vorschrift von *Embden*[2]) als Zinklactat isoliert.

Die Ringerlösung wurde von den Schnitten abgegossen. Die Schnitte wurden kurz mit Wasser gespült und dann bei 100° getrocknet und gewogen (2,7 g). Die Ringerlösung wurde mit 5 ccm konzentrierter Salzsäure und 10 g Sublimat, gelöst in 200 ccm Wasser, versetzt. Nach 14stündigem Stehen im Eisschrank wurde von einem geringen Niederschlag abgesaugt, mit Schwefelwasserstoff entquecksilbert, mit Natronlauge schwach alkalisch, mit Salzsäure ganz schwach sauer gemacht und im Vakuum bei 50° auf 90 ccm eingeengt. Dann wurde mit 15 ccm konzentrierter Phosphorsäure angesäuert, mit Ammonsulfat gesättigt und 48 Stunden im *Lind*schen Apparat mit Äther extrahiert.

Nach Zusatz von 40 ccm Wasser wurde der Äther auf dem Dampfbade verjagt, dann 3 Stunden auf dem Wasserbade mit Bleicarbonat erwärmt, 12 Stunden im Eisschrank stehengelassen, filtriert, mit Schwefelwasserstoff entbleit, filtriert, mit Luft der Schwefelwasserstoff verjagt, mit Zinkcarbonat 2 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt, filtriert, auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen eingeengt und schließlich an der Luft eingedunstet.

---

[1]) *Claude Bernard*, Leçons sur le Diabète, S. 328. Paris 1877.

[2]) *O. Neubauer* in Abderhaldens biochem. Arbeitsmethoden **5**, 2, 1254. Berlin 1912.

Der Rückstand kristallisierte durch und durch und war rein weiß. Er wog 0,6438 g.

Drehung: 0,1775 g des lufttrockenen Präparats wurden in Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf 10 ccm aufgefüllt. Im 1-dm-Rohr drehte sie gelbes Licht 0,153° nach links. Hiernach war

$$(\alpha)_D = -8{,}6^0.$$

Kristallwasser: 0,466 g des lufttrockenen Präparats wurden bei 110° bis zur Konstanz getrocknet. Gewichtsabnahme 0,0586 g oder 12,6 Proz. Für $(C_3H_5O_3)_2Zn + 2\,H_2O$ berechnet sich der Kristallwassergehalt zu 12,9 Proz.

Analysen: Das Zinklactat wurde aus wenig Wasser umkristallisiert, mit Alkohol gewaschen. Ausbeute beim Umkristallisieren 70 Proz. Es wurde bei 110° bis zur Konstanz getrocknet.

Analyse I: 4,930 mg gaben 5,370 mg CO_2, 1,685 mg H_2O und 1,645 mg Asche.

Analyse II: 4,995 mg gaben 5,400 mg CO_2, 1,795 mg H_2O und 1,680 mg Asche.

	Berechnet für $(C_3H_5O_3)_2$ Zn	Gefunden in I	Gefunden in II
ZnO	33,4	33,4	33,6
C	29,6	29,7	29,5
H	4,14	3,82	4,01

Es lag also *nach* dem Umkristallisieren reines und *vor* dem Umkristallisieren fast reines d-Lactat vor.

Die Ausbeute berechne ich aus der Menge des lufttrockenen, nicht umkristallisierten Präparats. Das Molekulargewicht von $(C_3H_5O_3)_2Zn + 2\,H_2O$ ist 279,4, die Ausbeute an Milchsäure also

$$0{,}644 \cdot \frac{180}{279} = 0{,}416 \text{ g}.$$

Da das Trockengewicht der Schnitte 2,7 g war, so hatten sich in 2 Stunden an Milchsäure gebildet

$$\frac{0{,}416}{2{,}7} \cdot 100 = 15{,}4 \text{ Proz.}$$

des Tumorgewichts.

Die Ausbeute an Milchsäure war hiernach geringer als bei dem manometrischen Verfahren[1]), das in guten Versuchen eine gleiche

[1]) Manometrische Messung der Glykolyse für das *Jensen*sche Rattensarkom findet man in den Arbeiten von *E. Negelein*, diese Zeitschr. **158**, 121, 1925, und *Y. Okamoto*, ebendaselbst **160**, 52, 1925.

Menge Milchsäure schon in einer Stunde liefert. Doch muß man bedenken, daß für Massenversuche die Schnitte nicht hinreichend dünn gemacht werden, ferner daß sie nicht so ausgewählt werden können wie für den Einzelversuch, und endlich, daß die Bewegung der Schnitte in der Ringerlösung beim Einzelversuch ausgiebiger ist als beim Massenversuch.

III.

Eine der wichtigsten Entdeckungen auf dem Gebiet der Krebsforschung verdanken wir *Peyton Rous*[1]), dem es gelang, mit Trockenpräparaten und zellfreien Filtraten von Hühnersarkomen Tumoren weiter zu impfen.

Herr *Peyton Rous* übersandte mir Trockenpulver eines Hühnersarkoms, das, mit Ringerlösung angerieben, zu fast 100 Proz. schnell wachsende Sarkome erzeugte. So war ich in der Lage, die Frage zu prüfen, ob der Stoffwechsel des *Rous*schen Sarkoms übereinstimmt mit dem Stoffwechsel der übrigen von uns geprüften bösartigen Tumoren.

Für die Versuche verwendete ich die weiße, nicht nekrotische Randschicht von Sarkomen, die etwa die Größe eines Hühnereis besaßen. Die Methodik war die früher beschriebene[2]), ein Protokoll folgt hierunter:

38,5°. Ringerlösung. $c_{NaHCO_3} = 2{,}5 \cdot 10^{-2}$. 0,2 Proz. Glucose. 5 Proz. CO_2. p_H etwa 7,4.

Gasraum	5 Proz. CO_2—O_2		5 Proz. CO_2—N_2
	Gefäß B	Gefäß A	Gefäß C
Volumina in ccm	$v_F = 8$ $v_G = 5{,}39$	$v_F = 3$ $v_G = 10{,}69$	$v_F = 3$ $v_G = 10{,}85$
Gefäßkonstanten in qmm	$K_{O_2} = 0{,}494$ $K_{CO_2} = 0{,}923$	$k_{O_2} = 0{,}95$ $k_{CO_2} = 1{,}11$	$k_{CO_2} = 1{,}13$
Schnittgewichte	1,56 mg *H*	1,73 mg *h*	1,56 mg *h*
In 30′	+ 13 mm	+ 14 mm	+ 21 mm
„ 30′	+ 12 „	+ 15 „	+ 20 „
	$\gamma = -4{,}76$ $Q_{O_2} = -5{,}2$ $Q^{O_2}_{CO_2} = +19{,}4$		$Q^{N_2}_{CO_2} + 29{,}7$

Das Ergebnis ist, daß der Stoffwechsel des *Rous*schen Hühnersarkoms in jeder Beziehung die Besonderheiten der übrigen von uns geprüften bösartigen Tumoren zeigt, also übereinstimmt mit den

[1]) *Peyton Rous*. Journ. Amer. Med. Association **56**. 198, 1911; Proceed. Amer. Philosoph. Soc. **51**, Nr. 205, 1912; Berlin. klin. Wochenschr. 1913, Nr. 14; ebendaselbst 1914, Nr. 27.

[2]) Diese Zeitschr. **152**, 51, 309, 1924.

menschlichen Spontancarcinomen und Sarkomen, mit dem *Flexner-Jobling*schen Rattencarcinom und dem *Jensen*schen Rattensarkom. Das *Rous*sche Hühnersarkom bildet unter anaeroben Bedingungen pro Stunde etwa 12 Proz. seines Gewichts an Milchsäure. Seine Atmung ist klein und reicht nicht aus, um die Glykolyse zum Verschwinden zu bringen, so daß — wie bei allen Tumoren — eine Glykolyse unter aeroben Bedingungen übrigbleibt. Das *Rous*sche Hühnersarkom bildet unter aeroben Bedingungen pro Stunde etwa 8 Proz. seines Gewichts an Milchsäure.

IV.

In zwei in dieser Zeitschrift erschienenen Arbeiten[1]) wurde die Wasserstoffionenkonzentration der Versuchs-Ringerlösungen nach der *Henderson-Hasselbalch*schen Gleichung

$$p_H = p_{K'} + \log \left[\frac{NaHCO_3}{CO_2}\right]$$

berechnet, worin $NaHCO_3$ und CO_2 die Gesamtkonzentrationen an Bicarbonat und Kohlensäure, beide in Molen pro Liter, bedeuten.

Für 38^0 habe ich $p_{K'} = 6{,}36$ gesetzt, während der richtige Wert 6,14 ist. Alle in den zitierten Arbeiten angegebenen p_H-Werte müssen unter diesen Umständen um 0,25 verkleinert werden. Insbesondere ist p_H unserer Ringerlösung nicht, wie wir glaubten, 7,66, sondern 7,41.

Herr Dr. *A. Baird Hastings* vom Rockefeller-Institut in New York hat mich auf diesen Fehler aufmerksam gemacht, wofür ich ihm auch hier vielen Dank sage.

[1]) Diese Zeitschr. **152**, 51, 1924; ebendaselbst **152**, 309, 1924.

Beitrag zur Frage der Einwirkung elektrischer Ströme auf Mikroorganismen.

(Untersuchung zur elektrischen Futterkonservierung.)

Von

Max Kleiber.

(Mitteilung aus dem Institut für Haustierernährung an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich.)

(Eingegangen am 16. Mai 1925.)

In den letzten Jahren hat, besonders in Deutschland, eine Methode zur Haltbarmachung von Grünfutter, das sogenannte Elfuverfahren, großes Aufsehen erregt. Das Verfahren ist kurz folgendes:

Man legt auf den Boden eines Silo (Behälter, meist aus Beton, von einigen Quadratmetern Grundfläche und einigen Metern Höhe zur Aufnahme von Futter) ein Gitter aus Eisenstäben, stampft gehäckseltes Futter darauf, legt auf die 1 bis 2 m hohe Futterschicht einen mit Blech beschlagenen Deckel und verbindet dann den Deckel mit dem einen, das Bodengitter mit dem anderen Pol einer Stromquelle, so daß nun das Futter selber als Leiter in den Stromkreis geschlossen ist. Außer der Erwärmung soll dann der elektrische Strom im Futterstock eine Spezialwirkung ausüben, worüber der Erfinder des Elektrosilo, dipl. agr. *Schweizer*, folgendes schreibt[1]:

„Vom Anfang des Stromdurchgangs an kann eine Art Lähmung, eine Unterbindung allen organischen Lebens in der Pflanzenmasse konstatiert werden. Auf was für Gründe diese Erscheinung zurückzuführen ist, ob sie aus Elektrolyse oder anderen Reaktionen abzuleiten ist, steht noch nicht fest. Sicher ist ihr Vorhandensein, und dieses ist auch in ausgedehnten, wissenschaftlichen Versuchsanstellungen einwandsfrei nachgewiesen worden. In dieser Feststellung liegt die Gewähr, daß mit dem Eintreten der Stromwirkung verlustbringende Zersetzungen, die die Qualität der Konserve ungünstig beeinflussen, ausgeschlossen sind.“

Die günstigen Berichte werden von mehreren Seiten bestätigt, besonders von Assessor *L. F. Kuchler*[2]) von der bayerischen Anstalt für Pflanzenbau und Pflanzenschutz, München, in der Internationalen Agrar-Rundschau, Rom 1923, der die Nährwertverluste bei der Elektrosilierung auf nur 1 bis 2 Proz. veranschlagt, gegenüber 20 bis 50 Proz. bei der Heubereitung.

---

[1]) *Theodor Schweizer*, Die Futterkonservierung, S. 26.

[2]) L'Ensilage Electrique en Allemagne par *L. F. Kuchler*, Revue Internationale de Renseignements Agricoles, 1, 4, 1923.

Die große volkswirtschaftliche Bedeutung einer verlustlos arbeitenden Futterkonservierung leuchtet ohne weiteres ein, was aber die Angelegenheit für den Biologen interessant macht, ist besonders der elektrisch bewirkte Lähmungsprozeß. *Kuchler* findet, daß das Futter durch die Wirkung des elektrischen Stromes steril wird, daß die Art, wie diese Wirkung zustande kommt, bisher unbekannt sei und daß dies Problem der Lösung harre.

Der Verfasser hat gerade dies Problem studiert im Zusammenhang mit Arbeiten über die Futterkonservierung am Züricher Institut[1]).

Historisches.

Die Versuche, den elektrischen Strom zur Bekämpfung von Mikroorganismen zu verwenden, sind nicht neu.

1890 beschreiben *Prochnownick* und *Spaeth*[2]) die Abtötung von Krankheitserregern durch galvanischen Strom; sie finden, daß nur die Anode keimtötend wirkt, während die Kathode beinahe unwirksam ist. Ähnliches beobachteten *Apostoli* und *Laquerriere*[3]). Die galvanische Sonde (Anode) wird empfohlen zur Bekämpfung der Gonorrhoe bei Frauen. Die genannten Forscher erklären die bakterizideWirkung des galvanischen Stromes durch an der Anode frei werdendes Chlor und geben an, daß bei Verwendung einer Platinsonde der Chlorgeruch deutlich wahrgenommen werden könne.

Im Jahre 1891 wird über ein Verfahren von *Webster*[4]) berichtet, wonach man Abwässer dadurch unschädlich machen kann, daß man sie zwischen Eisenplatten, welche als Elektroden dienen, passieren läßt. Das Verfahren wirkt sozusagen „elektrokolloidchemisch", es bildet sich nämlich bei der Elektrolyse $Fe(OH)_3$, welches koaguliert, zu Boden sinkt und dabei die Verunreinigungen mit sich reißt.

Wenig später sterilisierte man Abwässer nach dem System *Hermite*[5]). Man unterwarf Meerwasser oder künstlich hergestellte Lösungen von $NaCl$ und $MgCl_2$ der Elektrolyse. Dadurch wurden diese Lösungen nicht nur selbst steril, sondern wirkten auch als Zusätze zu Fäkalien und Abwässer antiseptisch. Als hierbei wirksames Agens wird eine Sauerstoffverbindung des Chlors vermutet.

Aber auch zur Sterilisierung von Trinkwasser ist der elektrische Strom schon verwendet worden. *Oppermann*[6]) hat mit viel Raffinement einen Apparat gebaut, worin Wasser dadurch sterilisiert werden kann, daß es von einem galvanischen Strom passiert wird, welcher an der Anode Ozon abscheidet.

Zur Erklärung der bisher genannten Verfahren elektrischer Bakterienvernichtung ist man nicht genötigt, einen Einfluß des elektrischen Stromes auf die Mikroorganismen selber anzunehmen; es handelt sich um Gleichstrom, der durch elektrolytische Zersetzung des Mediums Bakteriengifte oder fällende Stoffe bildet.

---

[1]) Zusammenfassender Bericht: *G. Wiegner, E. Crasemann, M. Kleiber*, Die Verluste bei der Konservierung, Landw. Jahrb. der Schweiz, 37. Jahrg., Heft 4, 1923.

[2]) *Prochnownick* und *Spaeth*, Deutsch. med. Wochenschr. **26**, 564—565, 1890.

[3]) *Apostoli* und *Laquerriere*, Münch. med. Wochenschr. **19**, 1890.

[4]) Chem. Centralbl. **1891**, I, 336.

[5]) *Klein*, Über das System *Hermite*, Hyg. Rundschau **8**, 337—339, 1894.

[6]) *Oppermann*, Hyg. Rundschau **19**, 865—873, 1894.

Beitrag zur Frage der Einwirkung elektrischer Ströme auf Mikroorganismen.

(Untersuchung zur elektrischen Futterkonservierung.)

Von

Max Kleiber.

(Mitteilung aus dem Institut für Haustierernährung an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich.)

(Eingegangen am 16. Mai 1925.)

In den letzten Jahren hat, besonders in Deutschland, eine Methode zur Haltbarmachung von Grünfutter, das sogenannte Elfuverfahren, großes Aufsehen erregt. Das Verfahren ist kurz folgendes:

Man legt auf den Boden eines Silo (Behälter, meist aus Beton, von einigen Quadratmetern Grundfläche und einigen Metern Höhe zur Aufnahme von Futter) ein Gitter aus Eisenstäben, stampft gehäckseltes Futter darauf, legt auf die 1 bis 2 m hohe Futterschicht einen mit Blech beschlagenen Deckel und verbindet dann den Deckel mit dem einen, das Bodengitter mit dem anderen Pol einer Stromquelle, so daß nun das Futter selber als Leiter in den Stromkreis geschlossen ist. Außer der Erwärmung soll dann der elektrische Strom im Futterstock eine Spezialwirkung ausüben, worüber der Erfinder des Elektrosilo, dipl. agr. *Schweizer*, folgendes schreibt[1]:

„Vom Anfang des Stromdurchgangs an kann eine Art Lähmung, eine Unterbindung allen organischen Lebens in der Pflanzenmasse konstatiert werden. Auf was für Gründe diese Erscheinung zurückzuführen ist, ob sie aus Elektrolyse oder anderen Reaktionen abzuleiten ist, steht noch nicht fest. Sicher ist ihr Vorhandensein, und dieses ist auch in ausgedehnten, wissenschaftlichen Versuchsanstellungen einwandsfrei nachgewiesen worden. In dieser Feststellung liegt die Gewähr, daß mit dem Eintreten der Stromwirkung verlustbringende Zersetzungen, die die Qualität der Konserve ungünstig beeinflussen, ausgeschlossen sind."

Die günstigen Berichte werden von mehreren Seiten bestätigt, besonders von Assessor *L. F. Kuchler*[2]) von der bayerischen Anstalt für Pflanzenbau und Pflanzenschutz, München, in der Internationalen Agrar-Rundschau, Rom 1923, der die Nährwertverluste bei der Elektrosilierung auf nur 1 bis 2 Proz. veranschlagt, gegenüber 20 bis 50 Proz. bei der Heubereitung.

---

[1]) *Theodor Schweizer*, Die Futterkonservierung, S. 26.

[2]) L'Ensilage Electrique en Allemagne par *L. F. Kuchler*, Revue Internationale de Renseignements Agricoles, 1, 4, 1923.

Die große volkswirtschaftliche Bedeutung einer verlustlos arbeitenden Futterkonservierung leuchtet ohne weiteres ein, was aber die Angelegenheit für den Biologen interessant macht, ist besonders der elektrisch bewirkte Lähmungsprozeß. *Kuchler* findet, daß das Futter durch die Wirkung des elektrischen Stromes steril wird, daß die Art, wie diese Wirkung zustande kommt, bisher unbekannt sei und daß dies Problem der Lösung harre.

Der Verfasser hat gerade dies Problem studiert im Zusammenhang mit Arbeiten über die Futterkonservierung am Züricher Institut[1]).

Historisches.

Die Versuche, den elektrischen Strom zur Bekämpfung von Mikroorganismen zu verwenden, sind nicht neu.

1890 beschreiben *Prochnownick* und *Spaeth*[2]) die Abtötung von Krankheitserregern durch galvanischen Strom; sie finden, daß nur die Anode keimtötend wirkt, während die Kathode beinahe unwirksam ist. Ähnliches beobachteten *Apostoli* und *Laquerriere*[3]). Die galvanische Sonde (Anode) wird empfohlen zur Bekämpfung der Gonorrhoe bei Frauen. Die genannten Forscher erklären die bakterizideWirkung des galvanischen Stromes durch an der Anode frei werdendes Chlor und geben an, daß bei Verwendung einer Platinsonde der Chlorgeruch deutlich wahrgenommen werden könne.

Im Jahre 1891 wird über ein Verfahren von *Webster*[4]) berichtet, wonach man Abwässer dadurch unschädlich machen kann, daß man sie zwischen Eisenplatten, welche als Elektroden dienen, passieren läßt. Das Verfahren wirkt sozusagen „elektrokolloidchemisch“, es bildet sich nämlich bei der Elektrolyse $Fe(OH)_3$, welches koaguliert, zu Boden sinkt und dabei die Verunreinigungen mit sich reißt.

Wenig später sterilisierte man Abwässer nach dem System *Hermite*[5]). Man unterwarf Meerwasser oder künstlich hergestellte Lösungen von NaCl und $MgCl_2$ der Elektrolyse. Dadurch wurden diese Lösungen nicht nur selbst steril, sondern wirkten auch als Zusätze zu Fäkalien und Abwässer antiseptisch. Als hierbei wirksames Agens wird eine Sauerstoffverbindung des Chlors vermutet.

Aber auch zur Sterilisierung von Trinkwasser ist der elektrische Strom schon verwendet worden. *Oppermann*[6]) hat mit viel Raffinement einen Apparat gebaut, worin Wasser dadurch sterilisiert werden kann, daß es von einem galvanischen Strom passiert wird, welcher an der Anode Ozon abscheidet.

Zur Erklärung der bisher genannten Verfahren elektrischer Bakterienvernichtung ist man nicht genötigt, einen Einfluß des elektrischen Stromes auf die Mikroorganismen selber anzunehmen; es handelt sich um Gleichstrom, der durch elektrolytische Zersetzung des Mediums Bakteriengifte oder fällende Stoffe bildet.

---

[1]) Zusammenfassender Bericht: *G. Wiegner, E. Crasemann, M. Kleiber*, Die Verluste bei der Konservierung, Landw. Jahrb. der Schweiz, 37. Jahrg., Heft 4, 1923.

[2]) *Prochnownick* und *Spaeth*, Deutsch. med. Wochenschr. **26**, 564—565, 1890.

[3]) *Apostoli* und *Laquerriere*, Münch. med. Wochenschr. **19**, 1890.

[4]) Chem. Centralbl. **1891**, I, 336.

[5]) *Klein*, Über das System *Hermite*, Hyg. Rundschau 8, 337—339, 1894.

[6]) *Oppermann*, Hyg. Rundschau **19**, 865—873, 1894.

Von einer elektrischen Wirkung auf die Mikroorganismen selber berichten 1891 *Spilker* und *Gottstein*[1]). Nach ihnen kann man Micrococcus prodigiosus dadurch töten, daß man die Kultur in destilliertem Wasser zerteilt in einem Solenoid 24 Stunden lang von einem Strom mit 2 Amp. Stärke umfließen läßt. Verseuchtes Blut und infizierte Gewebestücke können durch gleiche Behandlung in kürzerer Zeit sterilisiert werden; leider gelang es nicht, lebendige Mäuse, die von einer Infektionskrankheit befallen waren, dadurch zu heilen, daß man sie oder ihren Käfig einfach mit ein paar Drahtwindungen umwickelte und durch diese einen elektrischen Strom schickte.

D'Arsonal und *Chanin*[2]) haben beobachtet, daß Bac. pyocyaneus sein Vermögen, einen blauen Farbstoff zu produzieren, verliert, wenn er in einem Solenoid von einem hochfrequenten elektrischen Strom umkreist wird.

Wie man sich die Entstehung nennenswerter elektrischer Ströme, offenbar Wirbelströme, in einer solchen Bakteriensuspension innerhalb eines Solenoids vorzustellen hat, ist nicht klar. *Friedental*[3]) konnte auch bei einer Nachprüfung 1896 die merkwürdigen Ergebnisse von *Spilker* und *Gottstein* nicht bestätigen. Noch genauere Untersuchungen über diese Frage haben 1899 *Thiele* und *Wolf*[4]) angestellt. Sie fanden bei einer Stromdichte von 0,2 bis 0,3 Amp./qcm bei Ausschaltung von chemischen und thermischen Einflüssen des Stromes weder bei Gleichstrom noch bei Wechselstrom einen Einfluß auf Bakterien.

Dessen ungeachtet, erfanden im Jahre 1904 *Guarini* und *Samarani*[5]) ein Verfahren, Milch durch elektrischen Strom, und zwar Wechselstrom, steril zu machen. Sie wandten zum Studium der Stromwirkung den Kunstgriff an, die schwer zu beobachtenden Bakterien in der Milch zu ersetzen durch gut zu beobachtende Fische in Wasser, und fanden, daß ihre Bakterienstellvertreter durch relativ geringe elektrische Ströme zugrunde gingen.

Zuverlässigere Berichte als über elektrische Bakterientötung haben wir naturgemäß über den Einfluß des elektrischen Stromes auf größere Lebewesen. Besonders über den Einfluß des galvanischen Stromes auf Protisten haben eine Anzahl berühmter Physiologen Versuche angestellt, meist um den Galvanotropismus zu erforschen; es sei erinnert an die Arbeiten von *Verworn, Loeb, Ludloff, Engelmann, Coehn, Carlgren* im Pflügerarchiv und im Archiv für Anatomie und Physiologie.

Verworn[6]) beschreibt als Einfluß des galvanischen Stromes auf marine Rhizopodien bei längerer Einwirkung einen körnigen Zerfall des Protoplasmas von der Anodenseite her (heute würde man diese Erscheinung wohl als Koagulation bezeichnen), er beobachtet auch eine Ansammlung von hyalinem, durchsichtigem Plasma an der Kathodenseite.

Diese Koagulation des Protoplasmas von der Anodenseite her hat in neuester Zeit auch *Scheminzky*[7]) an Forelleneiern beobachtet. Er erklärt diese Koagulation durch Kationenentzug und daheriges Ausfallen des Globulins.

---

[1]) *W. Spilker* und *A. Gottstein*, Centralbl. f. Bakt. **9**, 77—78, 1891.
[2]) C. r. d. l. soc. biol. 1893, S. 467.
[3]) Centralbl. f. Bakt. **20**, 505—508, 1896.
[4]) Ebendaselbst **25**, 650—655, 1899.
[5]) *Guarini*, Zeitschr. f. Elektrochem. **1**, 693, 1904.
[6]) *Max Verworn*, Pflügers Arch. **62**, 415—450, 1896.
[7]) *Ferd. Scheminzky*, diese Zeitschr. **132**, 154—164. 1922.

Theoretisches.

Der Gedanke, daß man durch elektrische Ströme Bakterien vernichten könne, drängt sich ja auf, wir sind gewohnt, das, was wir unter bestimmten Bedingungen beobachten, auch auf andere Verhältnisse, insbesondere auf andere Dimensionen zu übertragen. Experimentell sind spezifisch elektrische[1]) Wirkungen von Strömen auf Mikroorganismen nur schwierig zu trennen von Wirkungen auf das Medium, gerade darum liegt es besonders nahe, mit größeren Organismen zu experimentieren und die Resultate dann auf die Mikroorganismen zu übertragen. Es soll im folgenden der Versuch einer solchen Übertragung erörtert werden.

Die Wirkungsgröße eines elektrischen Stromes ist allgemein eine Funktion der Stromstärke; es ist wahrscheinlich, daß auch das Ausmaß der physiologischen Wirkung von der Stromstärke bestimmt ist. In der *Nernst*schen Reizgleichung ist diese Annahme zum Ausdruck gebracht[2]); von einem Strom, der für den Menschen gefährlich ist, gibt man auch die Stromstärke an. Wenn durch den Körper 50 Milliamp. fließen, so besteht Lebensgefahr, sofern es sich nicht um Hochfrequenzströme handelt. Ob in einem gegebenen Falle diese Stromstärke erreicht wird, hängt in bekannter Weise gemäß dem *Ohm*schen Gesetz von der Spannung und dem Widerstand ab. Zum Vergleich der Wirkung eines Stromes in größeren und kleineren Organismen, z. B. Forelleneiern und Bakterien, ist natürlich die Stromstärke als Maß untauglich, es kann dazu nur die *Stromdichte*. die Stromstärke pro Einheit des Leiterquerschnitts verwendet werden.

Nehmen wir an, das Protoplasma der Bakterien sei in bezug auf Empfindlichkeit dem elektrischen Strome gegenüber gleich beschaffen wie dasjenige der Forelleneier oder der Protisten, und setzen wir voraus, daß die physiologische Wirkung des Stromes von der Stromdichte bestimmt sei, so läßt sich die uns hier beschäftigende Frage: Unter welchen Bedingungen wird der elektrische Strom Bakterien ebenso töten wie Forelleneier oder Protisten, überführen in die einfachere Frage: *Unter welchen Bedingungen ist die Stromdichte in Bakterien gleich groß wie in Forelleneiern oder Protisten?*

Die Stromdichte ist proportional dem Spannungsgefälle und umgekehrt proportional dem spezifischen Widerstand. (In den Arbeiten über unser Thema fehlt leider meist die Angabe des Spannungsgefälles, bei einigen läßt es sich zur Not aus anderen Angaben berechnen.) Hätten die Organismen keine Membranen, so wäre die Stromdichte bei gegebenem Spannungsgefälle unabhängig von der Größe des Organismus, bei Berücksichtigung der Membranen wird das Verhältnis aber durchaus geändert, weil diese den Strom bedeutend schlechter leiten als das Zellinnere, wie Widerstandsmessungen des Verfassers an Pflanzenteilen ergeben haben in Übereinstimmung mit Befunden *Teregs*[3]) an tierischen Geweben.

Nehmen wir an, kubisch geformte Organismen verschiedener Größe hätten eine gleiche, z. B. 0,1 μ dicke Membran, das Protoplasma habe die

---

[1]) Spezifisch elektrisch soll eine Wirkung heißen, bei welcher die elektrische Energie nicht außerhalb des Organismus in eine andere Energieform übergeführt wird.

[2]) Für einen Strom, der einen Nerv eben noch reizt, gilt danach die Gleichung $i = k\sqrt{m}$. i = Stromstärke (Amplitude in Milliampere), m = Frequenz, k = Konstante 0,079; zitiert in *Bernstein*, Elektrobiologie, S. 144.

[3]) *J. Tereg*, Arch. f. Physiol. 1899, S. 288–325.

gleiche spezifische Leitfähigkeit und der spezifische Widerstand des Membranmaterials sei in allen Fällen 500mal größer als der spezifische Widerstand des Zellinhalts, so gibt folgende Tabelle Aufschluß über die Stromdichte im Innern der Organismen bei gleichem äußeren Spannungsgefälle.

Einfluß der Größe von Organismen (kubische Form) mit gleichen Membranen (von 0,1 μ Dicke) auf die Stromdichte in ihrem Innern bei 1 Volt äußerem Spannungsgefälle und 100 Ω spez. Widerstand des Innern.

l Innere Kantenlänge cm	Q Innerer Querschnitt qcm	Wi Widerstand des Innern $= 100 \cdot l/Q$ Ω	Wm Widerstand der beiden vom Strom quer durchflossenen Membranen $= \frac{100 \cdot 500^{*}) \cdot 2 \cdot 10^{-5}}{Q}$ Ω	W Gesamtwiderstand des Organismus $= Wi + Wm$ Ω	V Gesamtspannung am Organismus bei 1 Volt/cm^{-1} äußerem Spannungsgefälle Volt	S Stromstärke im Organismus $= V/W$ Amp.	S cm^{-2} *Stromdichte* $= S/Q$ Amp.	
10	100	10	0,01	10,01	10	1	$1 \cdot 10^{-2}$	
1	1	100	1	101	1	$0{,}99 \cdot 10^{-2}$	$0{,}99 \cdot 10^{-2}$	Forelleneier
0,1	0,01	1000	100	1100	0,1	$0{,}91 \cdot 10^{-4}$	$0{,}91 \cdot 10^{-2}$	Protisten
0,01	10^{-4}	10^{4}	10^{4}	$2 \cdot 10^{4}$	0,01	$0{,}5 \cdot 10^{-6}$	$0{,}50 \cdot 10^{-2}$	
0,001	10^{-6}	10^{5}	10^{6}	$11 \cdot 10^{5}$	10^{-3}	$0{,}09 \cdot 10^{-8}$	$0{,}09 \cdot 10^{-2}$	Hefezellen
0,0001 $= 1\,\mu$	10^{-8}	10^{6}	10^{8}	$101 \cdot 10^{6}$	10^{-4}	$0{,}01 \cdot 10^{-10}$	$0{,}01 \cdot 10^{-2}$	Bakterien

*) Spezifischer Widerstand des Membranmaterials 500mal höher veranschlagt als spezifischer Widerstand des Zellinnern. Es ist nur der Teil der Membran berücksichtigt, der vom Strom quer durchflossen ist.

Sind in einem Medium den Voraussetzungen entsprechende Organismen von der Größe der Forelleneier und derjenigen der Bakterien nebeneinander, so ist bei Durchströmung die Stromdichte in den letzteren 100mal kleiner als in den großen Organismen. Um die Wirkung, die *Verworn* an Protozoen und *Scheminzky* an Forelleneiern beobachtete, auch an Bakterien hervorzurufen, müßte man also ein viel höheres Spannungsgefälle anlegen.

Noch stärker als in dem gewählten Beispiel müßte sich der Einfluß der Organismengröße geltend machen, wenn zur Erzeugung einer Wirkung — z. B. Ausfällen von Globulin — eine Minimalspannung innerhalb der Zelle nötig ist (wobei der Organismus dann eine elektrolytische Zelle für sich darstellt), dann muß das Spannungsgefälle in der Bakteriensuspension etwa 2000mal größer sein als dasjenige in einer Forelleneiersuspension, wenn eine elektrische Wirkung, die bei den Forelleneiern (die linear etwa 2000mal größer sind als Bakterien) eben auftrat, auch in den Bakterien auftreten soll.

Was durch diese Ausführungen dargetan werden soll, ist der Nachweis, daß es zum Schließen von der elektrischen Wirkung eines Stromes bei großen Organismen auf die Wirkung bei kleinen etlicher Umrechnung bedarf; erst recht geht es natürlich nicht an, wie *Guarini* die in der Milch suspendierten Mikroben einfach zu ersetzen durch im Wasser schwimmende Fische, denn es ist, abgesehen von dem Einfluß der verschiedenen Größe, der hier erörtert wurde, auch anzunehmen, daß Organismen mit Blut- und Nervensträngen gegenüber der Einwirkung elektrischer Ströme viel empfindlicher sind als Einzeller, nicht nur, weil in ihnen einzelne Gewebe

auf elektrische Einflüsse besonders stark reagieren, sondern auch, weil sich in einzelnen Geweben, speziell in den Blutbahnen, die besser leiten als der übrige Organismus, die Strombahnen konzentrieren[1]).

Eigene Versuche.

a) Einfluß des elektrischen Stromes auf die thermische Abtötungsgrenze von Gärungserregern.

Besser bekannt als die elektrischen sind begreiflicherweise die thermischen Wirkungen auf Mikroorganismen; durch Erwärmung auf eine bestimmte Temperatur kann man bestimmte Mikroorganismen töten. Es war nun für die uns hier interessierende Frage von Interesse, zu untersuchen, ob die Temperatur, bei welcher Mikroben zugrunde gehen, verschieden sei, je nachdem man das Medium in üblicher Weise von außen oder aber dadurch heizt, daß man einen elektrischen Strom durch das Medium fließen läßt (elektrolytische Heizung). Stellt es sich nämlich heraus, daß bei elektrolytischer Heizung die Mikroben schon bei tieferer Temperatur vernichtet werden als bei der Heizung von außen, so darf man daraus schließen, daß der elektrische Strom außer der thermischen noch eine andere Wirkung ausgeübt hat; dies kann eine chemische Veränderung des Mediums sein, sofern Gleichstrom verwendet wurde; eine Herabsetzung der thermischen Abtötungsgrenze durch Wechselstromheizung ließe indessen eine spezifische elektrische Beeinflussung der Organismen vermuten, da bei Wechselstrom schon bei der gewöhnlichen Frequenz (50 Per.) elektrolytische Zersetzungen nicht oder nur in ganz unbedeutendem Maße auftreten.

Heizversuche.

Von süßem Apfelmost wurde in je einem großen Becherglas 1 Liter elektrolytisch geheizt (*E*), ein zweites Liter von außen (*W*). Die elektrolytische Heizung geschah in der Weise, daß zwei Kohlenstifte in den Most getaucht und mit der Lichtleitung verbunden wurden (Wechselstrom 110 Volt, 50 Perioden). Das Spannungsgefälle betrug 16 Volt pro Zentimeter.

Der Most hatte anfänglich eine Temperatur von 20°; wenn die Temperatur durch die Heizung um 10° gestiegen war, so wurde jeweils mittels steriler Pipette eine Probe entnommen und in sterile Gärkölbchen gefüllt; die ganze Prozedur dauerte etwa 3 Stunden; die Gärkölbchen wurden bei 30° aufgestellt.

---

[1]) *v. Neegaard* beobachtete z. B., daß der durchschnittliche spezifische Widerstand des Hundekörpers dreimal größer war als derjenige des Blutes. *K. v. Neergaard*, Arch. f. klin. Chirurgie **122**, 1, 100–150, 1922.

Es resultierte:

Versuch über die thermische Abtötungsgrenze bei Hefe.

Stunden seit dem Aufstellen bei 30°	Kohlensäurebildung in den Gärkölbchen													
	Most elektrolytisch geheizt auf (Wechselstrom 16 Volt . cm⁻¹):							Most von außen geheizt auf:						
	20°	30°	40°	50°	60°	70°	80°	20°	30°	40°	50°	60°	70°	80°
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Sp	Sp	Sp	0	0	0	0	Sp	Sp	Sp	0	0	0	0
3	Sp	Sp	Sp	0	0	0	0	Sp	Sp	Sp	Sp	0	0	0
6	Sp	Sp	Sp	0	0	0	0	Sp	Sp	Sp	Sp	0	0	0
24	54	78	56	57	0	0	0	70	62	50	53	Sp	0	0
26	58	m	58	70	0	0	0	m	77	56	60	Sp	0	0
30	60	m	58	m	0	0	0	m	m	58	62	Sp	0	0
48	m	m	m	m	m	0	0	m	m	m	m	m	0	0

Es bedeutet: 0 = keine CO_2, Sp = eine Spur CO_2, eine Zahl = CO_2-Säule in mm, m = ganzes Steigrohr voll CO_2.

Bei beiden Arten der Heizung blieb der Most von 70° an ohne Gärung. Da die Steigröhren der Gärkölbchen alle gleich weit waren, so sind die gleichzeitig gemessenen Höhen der CO_2-Säulen einigermaßen vergleichbare Maße für die bis zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich stattgehabte Gärintensität; leider waren nur einmal alle diese Höhen gleichzeitig meßbar (24 Stunden nach dem Aufstellen der Kölbchen). Bei dieser Messung betrug:

Die Summe der CO_2-Säulen beim elektrolytisch geheizten Most 24,5 cm.

Die Summe der CO_2-Säulen beim von außen geheizten Most 23,5 cm.

Beim elektrolytisch geheizten Most war die Gärintensität bei dieser Messung etwas größer, doch liegt der Unterschied zweifellos innerhalb der Versuchsfehler, ebenso das Ergebnis, das zu gegenteiligen Schlüssen verleiten könnte, daß das Eintreten der Gärung bei den auf 50 und 60° erhitzten Proben bei dem von außen geheizten Most etwas früher beobachtet werden konnte als bei den entsprechenden Proben des elektrolytisch geheizten Mostes:

Wechselstrom (50 Perioden, 16 Volt pro Zentimeter) hat bei diesem Versuch weder auf die thermische Abtötungsgrenze noch auf die Gärfreudigkeit der nicht bis zur Vernichtung erhitzten Pilze einen Einfluß ausgeübt.

Mit einigen Vorbehalten kann zum Vergleich mit diesem Wechselstromversuch ein späterer mit Gleichstrom herangezogen werden, bei dem statt Most Bierwürze verwendet wurde. Bei diesem resultierte:

Versuch über die thermische Abtötungsgrenze bei Hefe.

Stunden seit dem Aufstellen der Gärkölbchen bei Zimmertemp.	Kohlensäurebildung in den Gärkölbchen											
	Mit Gleichstrom elektrolytisch geheizt						Von außen geheizt					
	20°	30°	40°	50°	60°	70°	20°	30°	40°	50°	60°	70°
6	58	60	50	0	0	0	58	68	m	44	0	0
8	68	72	67	0	0	0	72	m	m	55	0	0
22	m	m	m	Sp	0	0	m	m	m	m	0	0
28	m	m	m	23	0	0	m	m	m	m	0	0
34	m	m	m	58	0	0	m	m	m	m	0	0
48	m	m	m	m	0	0	m	m	m	m	0	0
72	m	m	m	m	m	0	m	m	m	m	0	0

Anmerkungen siehe vorige Tabelle.

Die elektrolytische Heizung mit Gleichstrom hatte, verglichen mit der Heizung von außen, eine deutliche Beeinträchtigung der Gärfreudigkeit der nicht bis zur Vernichtung erhitzten Pilze zur Folge (späterer Beginn der Sichtbarkeit der Gärung sowohl als auch verminderte Gärintensität). Die thermische Abtötungsgrenze wurde indessen auch durch elektrolytische Gleichstromheizung nicht herabgesetzt. (Sie erscheint im Gegenteil erhöht, doch ist das Nichteintreten der Gärung im von außen auf 60° erhitzten Medium vermutlich zufällig.)

b) Einfluß des elektrischen Stromes auf die Gärtätigkeit.

Wenn der elektrische Strom Mikroorganismen töten kann, so ist anzunehmen, daß man schon bei Strömen, die noch keine tödliche Wirkung haben, einen Einfluß auf die Lebensäußerungen beobachten kann; d. h. die Lebensäußerungen sind — sofern man sie gut messen kann — vermutlich ein empfindlicheres Reagens auf eventuelle Einflüsse des elektrischen Stromes als die Feststellung der Abtötung. Die Alkoholgärung ist nun eine Mikrobentätigkeit, deren Ausmaß und Verlauf sich gut quantitativ verfolgen läßt; außerdem sind die Hefepilze größer als die meisten Bakterien, sie werden daher gemäß unseren theoretischen Überlegungen von Strömen mit gleichem Spannungsgefälle stärker beeinflußt werden als die Bakterien. Aus diesen Gründen schien mir gärende Hefe ein besonders geeignetes Versuchsobjekt zum Studium der Frage, wie elektrische Ströme die Mikrobentätigkeit beeinflussen können.

Versuche über Gärung während des Stromdurchganges.

Als *Versuchsmaterial* diente eine Zerteilung von auf dem Gipsblock getrockneter, untergäriger Brauereihefe in steriler Bierwürze[1]). Diese

[1]) Herr Dr. *Fries*, Direktor der wissenschaftlichen Versuchsstation schweizerischer Brauereien hat mir in weitherziger Weise mehrmals Hefe und Würze zur Verfügung gestellt und mir fachmännischen Rat zuteil werden lassen, wofür ich ihm auch hier meinen besten Dank sage.

Suspension wurde in ein horizontales Glasrohr von 2,5 qcm Querschnitt und 29 cm Länge gebracht, das sowohl an beiden Enden als auch in der Mitte je einen senkrechten Ansatz hatte (in die beiden Endansätze kamen als Elektroden Kohlenstifte, später zur Kontrolle Platinspatel), aus dem mittleren Ansatz wurden die zu untersuchenden Proben entnommen. Von der Suspension wurde bei jedem Versuch ein Quantum in einem Erlenmeyerkölbchen in gleich hoher Schicht aufgestellt wie im Elektrolysierrohr und daran der Verlauf der Gärung ohne Strom festgestellt. Das spezifische Gewicht der Würze wurde von Zeit zu Zeit pyknometrisch gemessen. Die Änderung des spezifischen Gewichts ist ein Maß für die Gärtätigkeit.

Es wurde mit Gleichstrom und mit Wechselstrom experimentiert mit einer Spannung von 3 bis 4 Volt pro Zentimeter, was einer Stromdichte im Medium von 7 bis 8 Milliampere pro Quadratzentimeter entsprach.

Es wurde gefunden:

Gärversuche mit Gleichstrom (Kohlenelektroden).
Temperatur der elektrolysierten Würze . . . . . 24°
Temperatur der Würze ohne Strom . . . . 19°

Stunden seit Beginn	Spez. Gew. der Würze		Änderung des spez. Gew.	
	Gleichstrom	ohne Strom	Gleichstrom	ohne Strom
0	1,0438	1,0438		
24	1,0313	1,0267	0,0125	0,0171
48	1,0292	1,0191	0,0146	0,0247

Durch Gleichstrom ist die Gärung deutlich gehemmt worden. Nach 48 Stunden war unter Gleichstrom die Gärwirkung nur 60 Proz. derjenigen der Kontrollprobe, trotzdem die elektrolysierte Würze eine für die Gärung günstigere Temperatur hatte[1]).

Gärversuch mit Wechselstrom (Kohlenelektroden).
Temperatur der elektrolysierten Würze . . . . . 24°
Temperatur der Würze ohne Strom . . . . 21°

Stunden seit Beginn	Spez. Gew. der Würze		Änderung des spez. Gew.	
	Wechselstrom	ohne Strom	Wechselstrom	ohne Strom
0	1,0438	1,0438		
48	1,0127	1,0141	0,0311	0,0297

[1]) Durch Elektrolyse verschwindet Wasser aus der Würze; dadurch steigt natürlich deren spezifisches Gewicht. Dies stört aber das Ergebnis des Versuchs nicht, denn es läßt sich leicht berechnen, daß diese Wasserzersetzung das spezifische Gewicht um höchstens 0,0001 pro Tag erhöhen kann.

Durch Wechselstrom ist im Gegensatz zu Gleichstrom die Gärung nicht gehemmt worden. Die Gärung war unter Strom sogar etwas lebhafter als ohne Strom, wahrscheinlich infolge der etwas höheren Temperatur[1]).

Es sei noch ein Kontrollversuch mit Platinelektroden angeführt:

Gärversuch mit Gleichstrom (Platinelektroden).

Stunden seit Beginn	Spez. Gew. der Würze		Änderung des spez. Gew.	
	Gleichstrom	ohne Strom	Gleichstrom	ohne Strom
0	1,0438	1,0438		
17,5	1,0383	1,0275	0,0055	0,0163
37,5	1,0330	1,0158	0,0108	0,0280
48	1,0310	1,0126	0,0128	0,0312
63	1,0292	1,0133	0,0146	0,0305
87	1,0268	1,0132	0,0170	0,0306

Das Resultat ist das gleiche wie beim Gleichstromversuch mit Kohlenelektroden[2]). Ein weiterer Versuch ergab ebenfalls dasselbe Resultat.

Wechselstrom (50 Perioden) beeinträchtigt die Gärung nicht, Gleichstrom von demselben Ausmaß 3 bis 4 Volt . cm^{-1} Spannungsgefälle, 7 bis 8 Milliampere . cm^{-2} Stromdichte hemmen die Gärung beträchtlich.

Ist nun aber diese Wirkung des Gleichstroms spezifisch elektrisch, ein elektrischer Einfluß auf die Hefezellen selbst, oder besteht sie in

[1]) Den gleichen Unterschied im Verhalten von Gleichstrom und Wechselstrom haben 1914 *Palladin* und *Milljak* bei der Gärung ohne lebende Hefe mit Hefanol beobachtet; sie vermuten, daß die steigernde Wirkung des Wechselstroms damit zusammenhänge, daß durch den Wechselstrom Wasser gespalten werde. *W. Palladin* und *G. Milljak*, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **4**, 323—342, 1914. Die steigernde Wirkung von Wechselstrom auf die Gärung von lebender Hefe wurde auch von *E. Hägglund* festgestellt, dieser ist der Ansicht, daß diese Erscheinung mit einer Stimulierung der Zymase durch den Wechselstrom zusammenhänge, auch spalte Wechselstrom von reiner Brenztraubensäure ohne Enzym CO_2 ab. (Diese Zeitschr. **70**, 164—170, 1915.)

[2]) Das spezifische Gewicht der Würze nimmt beim Gleichstromversuch auch nach tagelanger Einwirkung des Stromes immer weiter ab, dies ist aber nicht mehr eine Folge der Gärung, sondern wohl einer Verarmung der Würze an spezifisch schweren Stoffen durch Kataphorese und Fällung (Krustenbildung an der Anode). Ein Kontrollversuch mit steriler Bierwürze ergab zwar bei viertägiger Elektrolyse nur eine Verminderung des spezifischen Gewichts von 0,0005, es ist indessen anzunehmen, daß in Würze, die schon Alkohol enthält, infolge von dessen dehydratisierender Wirkung und der Verminderung der Viskosität der kataphoretische Wegtransport und die Fällung rascher vor sich gehen als in der unveränderten Würze.

einer durch elektrolytische Prozesse bedingten Veränderung des Mediums?

Zur Prüfung dieser Frage wurde Bierwürze, durch die 8 Tage lang Gleichstrom geflossen war, in ein Gärkölbchen gefüllt und ihr Hefe zugesetzt, deren Lebensfähigkeit durch einen Parallelversuch mit frischer Würze festgestellt wurde. Das Kölbchen blieb ohne Gärung. Würze, durch die 8 Tage lang Gleichstrom geflossen[1], ist also als Gärmedium ungeeignet.

Um nun weiterhin die Frage zu prüfen, ob es sich dabei um den Entzug von lebensnotwendigen Stoffen handelt oder aber um eine Bildung von Giftstoffen, wurde die elektrolysierte Würze wieder aus dem Kölbchen entfernt und frische Würze zu der im Kölbchen belassenen Hefe zugesetzt. Wären nun durch die Elektrolyse nur lebensnotwendige Stoffe entzogen worden, so hätte nach Zusatz der frischen Würze die Hefe wieder zu gären begonnen. Aber auch jetzt blieb das Kölbchen ohne Gärung; daraus kann geschlossen werden, daß durch achttägige Elektrolyse unter den angegebenen Bedingungen Bierwürze vergiftet wird.

Ist die Bierwürze bloß 24 Stunden unter der Einwirkung des Gleichstroms, so ist sie, wie andere Versuche gezeigt haben, noch gärfähig, ebenso sind in dieser Würze vorhandene Hefezellen noch lebenskräftig.

Bei den Heizversuchen wurde auch mit elektrolytischer Gleichstromheizung keine Herabsetzung der thermischen Abtötungsgrenze erreicht, trotzdem die Gärversuche auf eine Vergiftung des Mediums durch Elektrolyse schließen lassen; eine Rechnung klärt diesen scheinbaren Widerspruch auf:

Bei den Heizversuchen wird bei Annahme von 50 Proz. Wärmeverlust, was bei elektrolytischer Heizung reichlich bemessen ist, pro Liter und je 10^0 Temperaturdifferenz 20 Cal Energie gebraucht; es entsprechen 0,86 Cal = 1 Wattstunde = 3600 Voltcoulomb, 1 Cal somit 4200 Voltcoulomb, und 20 Cal also 84000 Voltcoulomb, das sind bei einer Spannung von 100 Volt 840 Coulomb. Während des ganzen Heizversuchs passieren danach (60^0 Temperaturdifferenz) 5000 Coulomb ein Liter des Mediums. Beim Versuch mit Gärung unter Strom gehen durch 80 ccm des Mediums 20 Milliampere, das macht im Tage $\frac{20 \cdot 24 \cdot 60 \cdot 60}{1000} = 1726$ Coulomb, und auf das Liter gerechnet 21600 Coulomb pro Tag. Beim Versuch mit Gärung unter Strom passierte also, auf gleiche Mengen des Mediums gerechnet, schon an einem Tage eine viermal so große Elektrizitätsmenge das Medium,

[1] Bei einem Durchgang von 21600 Coulomb pro Tag und Liter Würze.

wie beim ganzen Heizversuch durchging. Die Vergiftung des Mediums durch Elektrolyse erwies sich beim Gärversuch in 24 Stunden als noch ungenügend zur Abtötung der Sproßpilze; daß durch die viermal kleinere Elektrizitätsmenge — und diese ist ja für das Ausmaß der elektrolytischen Veränderung bestimmend — die thermische Abtötungsgrenze nicht erniedrigt wurde, erscheint danach begreiflich.

Weniger begreiflich erscheint uns aber nach diesen Untersuchungen, daß das Futter durch Elektrolysierung, um auf das anfängliche Thema zurückzukommen, steril werden soll. Meist wird mit Wechselstrom elektrolysiert, der, wie gezeigt, bei dem hier in Betracht kommenden Spannungsgefälle auf Hefepilze nicht einwirkt, auf Bakterien vermutlich erst recht nicht; aber auch wenn mit Gleichstrom elektrolysiert wird, so genügt die elektrolytische Zersetzung des Materials zu einer Sterilisierung vermutlich nicht. Man braucht nämlich zur Elektrolysierung von 100 kg Futter hoch gerechnet 4 Kilowattstunden, das sind bei einer für diesen Fall niedrig angenommenen Spannung von 100 Volt 144000 Coulomb, also pro 1 kg Futter 1440 Coulomb, mithin noch drei- bis viermal weniger als bei unseren Versuchen mit elektrolytischer Heizung im Becherglas, wo, wie wir gesehen, von einer elektrischen Abtötung keine Rede sein konnte.

Bakteriologische Untersuchungen an der Eidgenössischen Technischen Hochschule, die wir Herrn Prof. Dr. *Düggeli* verdanken, ergaben denn auch eine recht beträchtliche Vermehrung der Keime während und nach der Elektrosilierung, und *Scheunert* und *Schieblich*[1]) schreiben direkt von einer typischen Elektrosilagemikroflora, aber nichts von Sterilität.

Wir prüfen seit einigen Jahren die Frage, ob im Elektrofutter Gärungen stattfinden, aber auch mit chemischen Methoden; wir haben bisher kein Elektrofutter bekommen, das nicht ein Sauerfutter gewesen wäre, und zwar auch flüchtige Säuren enthalten hätte, während letztere im Grase nicht in nennenswerter Menge vorkommen[2]), wir haben auch in allen Fällen einen recht erheblichen Abbau von Nährstoffen[3]) feststellen müssen und sind geneigt, dafür hauptsächlich Gärungen verantwortlich zu machen neben der Pflanzenatmung, die übrigens, wie Respirationsversuche des Verfassers ergeben haben, durch Wechsel-

---

[1]) *A. Scheunert* und *M. Schieblich*, Illustr. Landw. Ztg. Berlin, 24. Februar 1923.

[2]) Im Elektrofutter 0,5 bis 2 Proz. gesamte flüchtige Säuren, im Gras etwa 0,1 Proz.

[3]) Vom Reinprotein des Grases gingen bei zwei Versuchen übereinstimmend durch Elektrosilierung 38 Proz. verloren, vom Produktionswert bei einem Versuch 30 Proz., beim anderen 43 Proz. der Stärkeeinheiten.

strom auch nicht und durch Gleichstrom nur bei hohen Stromdichten beeinträchtigt wird[1]) (250 Ampere pro Quadratmeter).

Zusammenfassung.

Es wird nach einem kurzen Überblick über frühere Versuche, Mikroben durch elektrischen Strom zu töten, die Frage diskutiert, wie man von elektrischen Wirkungen bei größeren Organismen (Forelleneier, Protisten) auf solche bei Mikroorganismen schließen könnte, und dargetan, daß durch den Einfluß der schlecht leitenden Membranen, der um so stärker hervortritt, je kleiner die Organismen sind, die Mikroorganismen vermutlich gegenüber elektrischen Einflüssen resistenter sind als größere Organismen, wie z. B. Forelleneier oder Protisten.

Aus Versuchen mit Hefe in Most und Bierwürze geht hervor, daß durch elektrolytische Heizung mit Gleichstrom und Wechselstrom bei 16 Volt. cm^{-1} Spannungsgefälle die thermische Abtötungsgrenze für Hefe gegenüber der Heizung des Mediums von außen nicht verschoben wird.

Durch Versuche mit Gärung unter Strom wird gezeigt, daß Wechselstrom mit 3 bis 4 Volt. cm^{-1} Spannungsgefälle und 7 bis 8 Milliampere pro Quadratzentimeter Stromdichte die Gärung nicht hemmt, daß dagegen Gleichstrom von demselben Ausmaß die Gärung beträchtlich hintanhält; es wird gezeigt, daß es sich bei diesem Effekt nicht um eine spezifisch elektrische Wirkung auf die Hefezellen handeln muß, daß nämlich eine Veränderung des Gärmediums (Bierwürze) stattfindet, wodurch dieses nicht nur die Gärfähigkeit verliert, sondern Hefezellen abzutöten vermag.

Aus diesen Befunden wird gefolgert, daß im Elektrosilo nicht mit einer Abtötung der Mikroflora gerechnet werden kann, welche Folgerung bestätigt wird durch bakteriologische und indirekt durch chemische Untersuchung von Elektrosilos.

---

[1]) *M. Kleiber*, Über die elektrische Konservierung von saftigem Futter. Dissertation Zürich 1924.

Untersuchungen über die Viskosität menschlicher Synovia.

Von

Justus Schneider.

(Aus dem pathologischen Institut der Universität Würzburg.)

(Eingegangen am 20. Mai 1925.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Wenn die reine Chemie der Synovialflüssigkeit schon der Gegenstand einiger Untersuchungen war, so hat man einer eventuellen Veränderlichkeit dieser Flüssigkeit unter pathologischen Verhältnissen bisher keine eingehenderen Untersuchungen gewidmet. Unter physiologischen Bedingungen bringt allerdings Wagners Handbuch (III. Abt., 1, S. 463) eine Gegenüberstellung von Analysen, die hier folgen:

	Synovia eines gemästeten Stallochsen (Ruhe) Prom.	Synovia des Weidetieres (Bewegung) Prom.
Wasser	969,9	948,5
Feste Stoffe	30,1	51,1
Muzinähnliche Stoffe	2,4	5,6
Albumin und Extraktivstoffe	15,7	35,1
Fett	0,6	0,7
Salze	11,3	9,9

Wenn ich auch diese Analysen unter allem Vorbehalt hier wiedergebe (die Summe der Promille beträgt auf keiner Seite 1000!), so sind sie vielfach übernommen worden und auch für mich insofern wertvoll, als ich nicht sicher bestimmen kann, welche der von mir gefundenen Werte als normale angesprochen werden dürfen.

Die Anregung zu vorliegenden Untersuchungen über die Veränderlichkeit der *Viskosität* der Gelenkschmiere gab mir Herr Geh. Rat Prof. *M. B. Schmidt*, in dessen Institut die Untersuchungen ausgeführt

wurden. Die klinische Beobachtung, daß zahlreiche Krankheiten, besonders Infektionskrankheiten, von Gelenkschmerzen begleitet sind, ohne daß an den Gelenken oder der Gelenkmembran ein anatomisches Substrat sich fand, legte es ihm nahe, daß diese Schmerzen vielleicht von einer Änderung des Chemismus der Gelenkschmiere begleitet wären. Und die Viskosität ist ja ein ungemein empfindlicher Indikator für Veränderungen in kolloidalen Systemen. Die Abhängigkeit des Zähigkeitsgrades von der Konzentration, dem Grade der Dispersität, der Hydrophilie „ist eine so innige und die Viskositätsmessung eine so feine, daß eine jede kleine Änderung des Zustandes der gelösten hydrophilen Kolloide unter dem Einfluß von Zusätzen, Erwärmung, Schüttelung, chemischer Umwandlung zum Ausdruck kommt. Die Viskosität gibt daher ein bequemes und äußerst feines Maß zur Bestimmung der Zustandsform und der Zustandsänderung des Kolloidbestandes einer Lösung" [*Schade* (1)].

Einigermaßen große experimentelle Schwierigkeiten ergaben sich für die technische Durchführung der Messungen. Wurden doch in zwei Richtungen Anforderungen gestellt, die keines der vorhandenen Viskosimeter erfüllte und eine eigene Konstruktion bedingten. Einmal war es die sehr geringe Menge des Materials. Durchschnittlich 10 cg! (Technik der Gewinnung: Bei leicht gebogenem Knie Einstich mit der Hohlnadel am lateralen Rande des lig. patellae, wo man den Gelenkspalt fühlen kann. Stichrichtung sagital etwas nach oben innen. Man gelangt in etwa 6 cm Tiefe, beim langsamen Herausziehen mit angezogenem Spritzenstempel erhält man in 70 Proz. der Fälle etwas Synovia. Gelenkeröffnung gibt sehr schlechte Ausbeuten.) Zum anderen zeigte sich schon bei den Vorversuchen eine ganz außerordentliche Variabilität, die zwischen dem Zwei- und Mehrtausendfachen des Wasserwertes schwankte. Dieses veranlaßte mich, die bisher verwendeten Beziehungen:

$$\text{Viskosität } \varrho = \frac{\text{Durchflußzeit des Materials}}{\text{Durchflußzeit des Wassers}}$$

und

$$\text{Viskosität } \varrho = \frac{\text{Durchflußmenge von Wasser}}{\text{Durchflußmenge von Material}}$$

zu erweitern durch Einführung veränderlichen Druckes, unter dem die zu vergleichenden Flüssigkeiten durch die Kapillare getrieben werden. Nach dem Gesetz von *Poiseuille* wächst die Durchflußmenge proportional dem Druck, sofern keine Turbulenz eintritt. Die Einführung dieser Beziehung ermöglichte es, daß sich die Beobachtungszeiten einigermaßen gleich blieben und nicht zwischen Sekunden und Tagen differierten.

Die Relation dieser drei mathematischen Beziehungen der Viskosität ϱ führte mich zu folgender Formel:

$$\varrho_s = \frac{T_s \cdot l_w \cdot p_s}{T_w \cdot l_s \cdot p_w},$$

die allen Messungen zugrunde liegt und in der T = Durchflußzeit, l = Durchflußmenge, p = Druck während der Messung, s = Synovia und w = zweifach destilliertes Wasser ist.

Eine den gegebenen Materialverhältnissen und den vorangegangenen physikalischen Erwägungen entsprechende Kapillarform wurde nach langen und zahlreichen Versuchen in Abb. 1 gefunden.

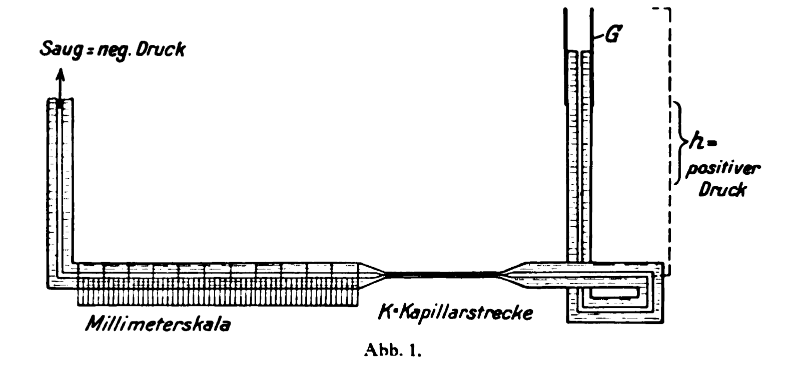


Abb. 1.

Hierbei wird zum Versuch, nachdem die Kapillare rein im physikochemischen Sinne ist, das Schlauchstückchen G auf der dickwandigen, licht etwa 0,8 mm weiten Kapillare abgenommen, die Synovia (zumeist 1 bis 2 Tropfen) aufgegossen und durch Saugen auf der anderen Seite des Kapillarrohres pipettenartig eingefüllt, bis der Spiegel der Synovia etwa 4 mm unter das Ende des Rohres gesunken ist; dann wird das Schlauchende aufgesetzt und mit Wasser bis zum Rande aufgefüllt, damit während des Versuchs auf dieser Seite der Kapillarstrecke K (Durchmesser etwa 0,05 mm) gleicher hydrostatischer Druck herrscht. Auf der Saugseite wird zum Versuch ein bestimmter negativer Druck angelegt, so daß im ganzen die Niveaudifferenz zwischen dem Wasserspiegel in G und dem horizontalen Röhrenteil plus dem Saugdruck wirken. Für den regelmäßigen Kontrollversuch mit Wasser wurde der Saugdruck weggelassen. Auf der Saugseite findet sich hinter der Kapillarenge K eine Millimeterskala, auf der die durchgeflossene Menge = l abgelesen werden kann, je nachdem viel oder wenig Synovia zur Verfügung stand. Die Zeit des Passierens zweier beliebiger Skalenteile durch den Kopf der Synoviasäule wird auf eine fünftel Sekunde

abgestoppt, wobei es sich als zweckmäßig erwies, T_w auf 10 cm Säulenlänge zu reduzieren, weil sich die logarithmische Berechnung vereinfacht.

Peinliche Einhaltung gleicher Temperatur (hier 22° C) für alle Versuche durch konstantes Wasserbad ist natürlich Voraussetzung. Zu diesem Zwecke wurde die beschriebene Kapillare in das *Ostwald*sche Viskosimeter eingebaut, das genügend Raum für diesen Zweck bot.

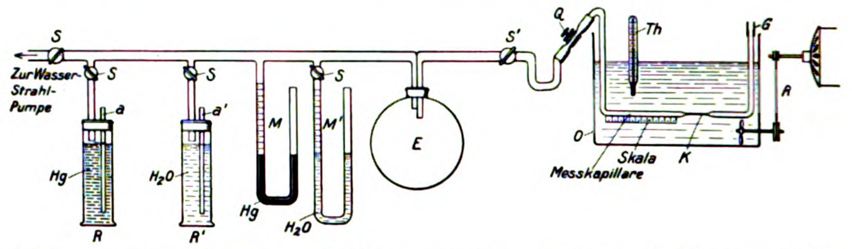


Abb. 2. R, R' = Regulatoren. S = Sperrhähne. M, M' = U-Manometer. E = Expansionsgefäß (zum Aufnehmen der kleinen Druckschwankungen durch das Aufperlen der Luftblasen in R bzw. R'). Th = Thermometer. R = Rührwerk. O = *Ostwald*sches Viskosimeter. K = Kapillarstrecke. Q = Quetschhahn zum Ansaugen des Materials nach Schluß von S'.

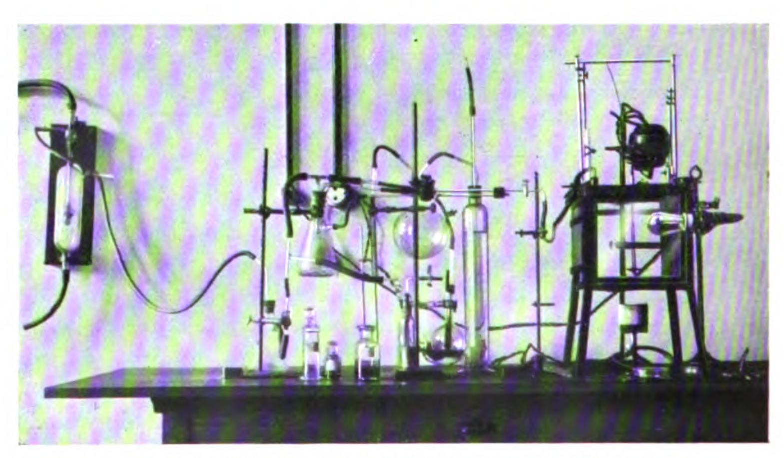


Abb. 3. Beispiel einer ausgebauten Apparatur (Würzburg).

Der notwendige variable, während des Versuchs durchaus konstante negative Druck wurde durch nachstehende Anordnung erzeugt, die ohne weiteres verständlich sein dürfte (Abb. 2 und 3).

Hierbei lassen sich die Röhren a und a' der beiden Regulatoren beliebig tief in das Quecksilber bzw. in das Wasser eintauchen und bewirken dadurch, daß kein höherer als der der Tauchtiefe entsprechende negative Druck auftreten kann. Quecksilber- und Wassermanometer

sind vorgesehen, um bei hohen (bis ½ Atm.) und bei niederen Unterdrucken genau deren Wert ablesen zu können.

Um sehr schwer zu beseitigende „Embolien“ in dem engen Kapillarteil durch Knorpel- oder Gewebsteilchen zu vermeiden, wurde die Synovia vorher filtriert, indem über das Gläschen, in dem sich die Synovia befand, ein Stück feinen Gewebes gebunden, darüber ein weiteres Gläschen gestülpt und das Ganze umgekehrt in eine Zentrifuge eingelegt wurde. So gelang die Filtration weniger Tropfen zähesten Materials.

Sofort nach dem Versuch wurde die Kapillare ganz mit konzentriertem Schwefelsäure-Bichromatgemisch gefüllt, das im Verlauf von 4 bis 6 Stunden die Kapillare säuberte.

Natürlich arbeitet, wie bei allen Viskosimetern, auch diese Methode nur relativ genau; andere Untersucher werden mit anderen Kapillaren andere absolute Werte finden, das Wesentliche ist die Verschiedenheit der Werte, die ich bei meiner Methode in den verschiedenen Fällen fand.

Für die Beurteilung der gefundenen Werte war es von Wichtigkeit, die Veränderungen der durch längere Zeit steril aufgehobenen Synovia zu untersuchen. Durch einen günstigen Zufall konnte bei der Arthrotomie bei Osteochondritis dissecans in der chirurgischen Klinik so viel sterile Synovia aufgefangen werden, daß durch 108 Stunden die Werte verfolgt werden konnten.

Tabelle

des zeitlichen Ablaufes der Veränderung der Viskosität steriler Synovia, die während der Gewinnung (Operation) zu etwa 10 Proz. mit 1proz. Novocain-Kochsalzlösung versetzt war:

nach 4	Stunden	war	ϱ = 22,7
„ 10	„	„	ϱ = 18,5
„ 28	„	„	ϱ = 18,7
„ 36	„	„	ϱ = 18,8
„ 50	„	„	ϱ = 19,6
„ 60	„	„	ϱ = 18,8
„ 108	„	„	ϱ = 18,2

Die Veränderungen betragen also nur wenige Prozent, wobei man bedenken muß, daß die Synovia in einem größeren Erguß kaum ganz homogen sein dürfte. Die immerhin bemerkenswerte Konstanz des Wertes beweist natürlich keineswegs, daß dieses das normale Verhalten sei.

Bei einigen Leichen konnte im zeitlichen Abstand einiger Stunden Synovia desselben Gelenkes gewonnen werden, wobei sich keine wesentliche Differenz ergab. Die im übrigen gefundenen Werte der Kniegelenksynovia sind nun tabellarisch dargestellt:

Personalien, Sektionsdatum	Viskosität	Pathologisch-anatomische Diagnose
K. H., 52 J., ♀, 13. XII. 24	3,9	Cavernöse Lungenphthise, Kehlkopftuberkulose
A. C., 18 J., ♀, 12. XII. 24	recht. Knie 7,2 link. Knie 4,0	Poliomyelitis anter. chron., Bronchopneumonie, Kreislaufschwäche, Ödeme
M. S., 29 J., ♀, 5. XII. 24	17,9	Cavernöse Lungenphthise, Kehlkopftuberkulose, Dünndarm Bauchfelltuberkulose, frische Darmperforation, Peritonitis
Aus der chir. Klin. *G. Kraft*	18—22	Gelenkerguß bei Osteochondritis dissecans
G. K., 86 J., ♂, 27. I. 25	19,9	Perforations-Peritonitis, chronische ausgedehnte Ruhr, arteriosclerotische Schrumpfniere, Marasmus
W. B., 58 J., ♀, 17. XII. 24	links 27,9 rechts 31,9	Schilddrüsen-Sa mit Metastasen, Aortensclerose
I., ♂, 22. I. 25	30,9	Myodegeneratio cordis, Stauungsorgane, Ödeme, Herzhyperthrophie, alte und frische Endocarditis
K., ♂, Chir. Klin., Op. 2. XII. 24	33,3	Gelenkmaus mit Erguß, klinisch sonst gesund
M. G., 51 J., ♀, 2. II. 25	42,2	Lungen- und Darmtuberkulose
S. B., 71 J., ♀, 15. I. 25	43,3	Bronchopneumonie, Thrombose der V. fem. r. und der V. iliaca l., alter haemorrhagischer Lungeninfarkt, Myodegen. cordis
K. S., 50 J., ♀, 11. II. 25	47,2	Ca. uteri, vereiterte Drüsenmetastasen, Bronchopneumonie
E. B., 54 J., ♀, 9. II. 25	57,4	Icterus, cholämische Blutungen in Herz- und Mageninnenhaut, chronische Cholecystitis, Cholangitis, Cholelithiasis, alte Pfortaderthrombose
I. W., 18 J., ♂, 2. XII. 24	59,8	Endarteriitis der Hirnarterien, chronische Leptomeningitis, maligne Sclerose der Nieren, Urämie, Herzhyperthrophie, Mesaortitis luetica
A. Z., 28 J., ♂, 7. II. 25	60,0	Alte Milzruptur, Thrombose, der V. lien., Darmulcusnarben, alte Arrosionshöhle in Pankreas, frische Arterienarrosion, Pankreasnekrose
H., 53 J., ♂, 22. I. 25	72	Cholelithiasis, subphren. Abzeß, Galleperitonitis
I. V., ♂, 9. I. 25	108,5	Alte Lungentuberkulose links, käsige Herde, frische Aussaat, frische Pleuritis rechts, Bronchopneumonie
I. Sch., 44 J., ♂, 27. I. 25	113,2	Aspirationspneumonie, Billroth II wegen ulcus, akute Endokarditis, Pyelitis rechts
A. H., 40 J., ♂, 8. II. 25	158,1	Lungen- und Darmtuberkulose, Stauungshyperthrophie der Leber
M. M., 40 J., ♀, 3. XII. 24	185	Frische Bronchopneumonie, alte, geheilte tuberkulöse Lungenherde
N. N., ♀, 30. I. 25	187	Peritonitis nach Bruchoperation. Chron. Cholecystitis, arteriosclerotische Schrumpfniere
K. W., 22 J., ♂, 10. II. 25	206	Suicid. Status thymolymphaticus, geheilter tuberkulöser Primäraffekt der Lunge
M. S., ♀, 22. I. 25	211	Ileus des gesamten Darmkanals post. part. Frische Mitralendocarditis
M. I., 14 J., ♂, 19. I. 25	275,3	Allgemeine Sepsis mit metastatischen Abszessen. Gelenkvereiterung. (In der Synovia keine Bakterien, wenig Leucocyten, zahlreiche große, helle, aus dem Gewebe ausgewanderte Zellen
R., 23 J., ♂, 22. I. 25	366,4	Hämorrhagische Infarzierung des gesamten Darmrohres, autochthone Mesenterialvenenthrombose

Personalien, Sektionsdatum	Viskosität	Pathologisch-anathomische Diagnose
N., 53 J., ♂, 19. I. 25	420	Spondylitis tbc., subperiostaler Abszeß. Tod durch Erhängen
H. S., 40 J., ♂, 26. I. 25	537,8	Harnblasenruptur, Peritonitis fibrinosa, Bronchopneumonie. Darmblutungen, alte Pleuritis rechts
K. G., 46 J., ♂, 4. XII. 24	857,4	Nekrotisierende Enteritis des Dünndarms, Stomatitis gangr. Hautblutungen, Bronchitis, (sehr akut verlaufen, Vergiftung?)
M. E., ♀, 15. I. 25	etwa 900	Uterusperforation, Peritionitis
L., 50 J., ♀, 28. XI. 24	1146	Peritonitis, Fettleber, trübe Nierenschwellung, suphren. Abszeß
W. Sch., 9 J., ♂, 10. II. 25.	1490	Hirnschuß, sonst o. B.

Bei diesen 30 Fällen gelang die Gewinnung von Synovia, wahllos wurde je nach Anfall des Materials untersucht. In zahlreichen Fällen konnten Kontrollmessungen vorgenommen werden, die weniger als 1 Proz. Differenz ergaben. Am auffallendsten dabei ist die enorme Variabilität zwischen 3,9 und 1490! Es gibt sonst keine normalerweise im Körper enthaltene Flüssigkeit, deren eine physikalische Konstante um das Vielhundertfache wechselte. Es ist dabei besonders bemerkenswert, daß die niedrigeren Werte sich ausschließlich finden, wenn chronische Krankheitsprozesse, besonders Tuberkulose, im Körper spielten. Unter den höheren Werten herrschen durchaus akute, rasch zum Tode führende Krankheitszustände vor, den höchsten Wert zeigte der Knabe, der, sonst völlig gesund, durch einen Kopfschuß ums Leben kam.

Dabei war ein Zusammenhang mit der Menge der Synovialflüssigkeit nicht nachweisbar, und die niedrigsten gefundenen Zahlen stammen aus Gelenken, die kaum mehr als normal gefüllt waren. Doch dürfte der Wassergehalt eine wesentliche Rolle spielen: Abdunsten von wenigen Prozenten Wasser brachte sehr große Änderungen hervor (z. B. von 1490 auf 3650 bei 5 Proz. Wasserentziehung). Eine große, vielleicht die größte Bedeutung dürfte einem Bestandteil zukommen, der dem Mucin verwandt ist (in etwa 40 Proz. meiner Untersuchungen fiel er durch schwache Säuren, in einigen Fällen durch Wasser aus), und der als Pseudomucin, Synoviamucin (2), Synovin (3) bezeichnet wird und der nicht identisch mit Mucin ist: „The resemblance of synovial fluid to mucin is more physical than chemical“ (4).

Zu erwähnen ist auch, daß in mehreren Versuchen gleicherweise in Synovia gewachsene Kolikulturen jene in 1 bis 2 Tagen fast zur Beweglichkeit von Wasser verflüssigten. In der frisch entnommenen Synovia wurden jedoch nie Spaltpilze nachgewiesen.

Wenn *Birch-Hirschfeld* (5) anführt, daß aus irgendwelchem Grunde entstandene größere Menge von Synovia sehr rasch resorbiert werden

kann, wenn andererseits *Labor* und *v. Balogh* (6) zu gleicher Zeit, wie im Blute, bei Infektionen (Typhus und Dysenterie) Agglutinine und Hämolysine auch in der Synovia nachwiesen, wenn ich selbst in zahlreichen Fällen an der Gelbfärbung der Synovia einen Ikterus erkannte, der an den Skleren noch kaum eine Verfärbung hervorgerufen hatte, so muß wohl der Stoffwechsel, die Erneuerung der Gelenkschmiere viel reger sein, als man anzunehmen gewohnt ist.

Man könnte bei wässeriger Beschaffenheit der Synovia wohl am meisten daran denken, daß in dem chronisch kranken Körper die Fähigkeit der Rückresorption des Wassers durch die Synovialmembran abnimmt, daß sie gewissermaßen die Konzentrationsfähigkeit dem Gelenkinhalt gegenüber verliert; jedenfalls gab die mikroskopische Untersuchung der Synovialmembran und die cytologische Untersuchung der Synovia mit Ausnahme des Falles mit Sepsis (s. Tabelle) nie einen Anhalt, daß etwa aktive Entzündung mit Exudatbildung eine Rolle gespielt hätten.

Ohne Zweifel aber sind die dem Tode unmittelbar vorangegangenen Ereignisse, z. B. große Unruhe bei Peritonitikern, lange Ruhe und Kreislaufschwäche bei marantischen Erkrankungen usw. von großer Wichtigkeit, wenn auch Ödeme sich fast nie in einer stärkeren Füllung des Gelenkes bemerkbar machen. Die anfangs gegebenen Analysen ruhender und sich bewegender Tiere würden sich ohne Zweifel in einem erheblichen Unterschied der Viskosität aussprechen. Die physiologische Variationsbreite wird also schon eine recht große, vielleicht zwischen 500 und 1500 gegen Wasser = 1 sein. Die Werte darunter dürften wohl nur unter krankhaften Bedingungen auftreten.

Was letzten Endes die Ursache der Verknüpfung des Viskositätswertes der Synovia mit dem Zustand des übrigen Körpers und, wie es nach diesen Untersuchungen zu sein scheint, besonders mit Krankheiten, die zunächst die Vitalität des Gesamtorganismus herabsetzen, ist, wird dann erst klar werden können, wenn vor allem die normalen biologischen und kolloidchemischen Vorgänge bei der Bildung der Synovia klargestellt und ihr Stoffwechsel näher bekannt ist, zumal heterogene Einwirkungen auf die Synovia wie auf jedes Kolloid sich in einer Viskositätsänderung gleichmäßig ausdrücken können.

Literatur.

1) *Schade*, Arbeitsmethoden 1921. — 2) *v. Holst*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **34**. — 3) *Salkowski*, Virchows Arch. **131**. — 4) *G. Wello*, Chem. Pathol., 2. Aufl. Philadelphia. — 5) *Birch-Hirschfeld*, Spec. path. Anat. 1887. — 6) *v. Labor* und *Balogh*, Wien. klin. Wochenschr. 1919, Nr. 20.

Fütterungsversuch an Ziegen mit Ammoniumacetat, Harnstoff und Hornmehl als Eiweißersatz.

Von

Ernst Paasch.

(Aus dem agrikulturchemischen und bakteriologischen Institut der Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Breslau.)

(Eingegangen am 21. Mai 1925.)

Allgemeine Übersicht.

Dieser Fütterungsversuch, der im Sommerhalbjahr 1923 am agrikulturchemischen Institut in Breslau ausgeführt wurde, sollte dazu beitragen, eine auch schon früher am Institut bearbeitete Frage zu lösen. Nämlich, welchen Einfluß bei reichlichem Produktionsfutter mit engem Eiweißverhältnis der Ersatz eines größeren Teiles von verdaulichem Reineiweiß durch einfachere N-Verbindungen — in diesem Falle Ammoniumacetat, Harnstoff und Hornmehl — auf die Milchproduktion sowie Art und Umfang der Verdauung der Nährstoffe ausübt. Damit schließt er eng an die Arbeit an, die 1922 von *Ungerer* am selben Institut ausgeführt und unterdessen in dieser Zeitschr. **147**, H. 3/4 veröffentlicht worden ist; er kann in mancher Hinsicht als deren Fortsetzung gelten.

Nach eingehenden Versuchen von *Völtz*[1]), *Morgen*[2]) und *Scheunert*[3]) können nichteiweißartige N-Verbindungen bei weitem Nährstoffverhältnis das Eiweiß hinsichtlich Fleischansatz und Milchproduktion beim Wiederkäuer im Gegensatz zu Tieren mit einfachem Magen in gewissem Umfang ersetzen. In den Jahren 1921 bis 1923 bemühten sich dann in getrennten Untersuchungen *Völtz*[4]), *Honcamp*[5]), *Hansen*[6]) und *Morgen*[7]) festzustellen, ob die Amidsubstanzen das Produktions-Futtereiweiß in seiner vollen Leistungsfähigkeit ersetzen könnten, und kamen auf Grund ihrer Arbeiten dazu, diese Frage bis zu einem gewissen Grade zu bejahen, da nach *Honcamp*[8])

---

[1]) *Völtz*, diese Zeitschr. **102**, 151, 1920.

[2]) *Morgen*, Die landwirtschaftl. Versuchsstationen **73**, 285, 1910; **75**, 265, 1911.

[3]) *Scheunert*, diese Zeitschr. **133**, 137, 1922.

[4]) *Völtz*, Landwirtschaftl. Jahrbücher **59**, 321, 1924.

[5]) *Honcamp*, Zeitschr. f. angew. Chem., Nr. 8, **36**, 45, 1923; *Honcamp* und *Schneller*, diese Zeitschr. **138**, 461, 1923.

[6]) *Hansen*, Landwirtschaftl. Jahrbücher **59**, 141, 1923.

[7]) *Morgen*, Die landwirtschaftl. Versuchsstationen **99**, 1, 1922.

[8]) *Honcamp*, diese Zeitschr. **143**. 155, 1923.

„in einer normale Mengen Reineiweiß enthaltenden Ration ein teilweiser Ersatz des Reineiweißes durch Harnstoff bis zu etwa 30 bis 40 Proz. ohne erhebliche Schädigung der Milchproduktion möglich sei". Allerdings wirkte nach den Versuchen *Hansens* selbst bei ausreichenden Mengen von Kohlenhydraten der Harnstoff auf die Lebendgewichtszunahme weniger günstig als das Eiweiß, wenn auch bei Dauerperioden eine allerdings nicht sehr große Zunahme an Lebendgewicht erfolgte. Wegen dieser im ganzen günstigen Ergebnisse wirft *Hansen*[1]) die Frage nach der allgemeinen Durchführung der Harnstoffütterung in der landwirtschaftlichen Praxis namentlich für Zeiten der Eiweißknappheit auf. Denn bekanntlich kann die Landwirtschaft die für die Viehfütterung erforderlichen Mengen von Kohlenhydraten selber verhältnismäßig leicht erzeugen im Gegensatz zu dem notwendigen Eiweiß, als deren Ersatz ihr dann synthetisch hergestellte N-Salze angeboten werden könnten. Demgegenüber glaubt *Th. Pfeiffer*[2]) aus den Angaben *Hansens* darauf schließen zu müssen, daß das günstige Resultat nur scheinbar durch Harnstoffverfütterung, in Wirklichkeit durch gleichzeitigen Fleisch- oder Fettabbau des Körpers erzielt worden sei; auch weist er mit Hilfe eingehender Rentabilitätsberechnungen die wirtschaftliche Unzweckmäßigkeit der Harnstoffütterung für die nächste Zeit nach. *Ungerer*[3]) schließt sich auf Grund der von ihm gefundenen Resultate dem Urteil *Pfeiffers* an. Die vorliegende Arbeit behandelt, wie eingangs erwähnt, ebenfalls das hier erörterte Problem.

Der Versuch wurde im Stalle des agrikulturchemischen Instituts mit dessen fünf Ziegen in Form des Periodensystems ausgeführt. Vier Ziegen dienten, um die Vorgänge des Stoffwechsels erkennen zu können, zu Ausnutzungsversuchen und kamen zu diesem Zwecke in Zwangsställe, gebaut nach dem in der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Leipzig-Möckern benutzten Muster. Die fünfte Ziege wurde als Reservetier mitgefüttert; infolgedessen finden nur ihre Milchleistungen in den betreffenden Tabellen Erwähnung. Alle fünf Ziegen waren bereits im Sommerhalbjahr 1922 für den Harnstoffütterungsversuch usw. von *Ungerer* benutzt worden. Durch Siebvorrichtung in den Zwangsställen wurden Kot und Harn getrennt; die aufgefangene Harnmenge, die stets in der Vorlage mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert wurde, wurde täglich gemessen, auf absoluten und prozentischen N-Gehalt untersucht; und vom Kote, der ebenfalls jeden Tag gewogen wurde, der 20. Teil täglich nach sorgfältigstem Durchmischen getrocknet und periodenweise analysiert; dabei ergaben parallel durchgeführte N-Aufschlüsse nach *Kjeldahl* mit frischem und getrocknetem Kote übereinstimmend, daß beim Trocknen bei 70° C während der Dauer von 24 Stunden N-Verluste nicht eintreten, um so weniger, als der Kot noch mit schwacher (2,5proz.) Oxalsäurelösung angesäuert wurde. Die Milchmenge, ihr Fett- und Trockensubstanzgehalt wurden täglich, ihr N-Gehalt nur periodenweise bestimmt; zu diesem Zwecke wurden gleiche Mengen Milch von jedem Tage, mit Chloroform konserviert, aufbewahrt. — Das Futter mußte jeder einzelnen Ziege täglich zugewogen werden. Dazu wurde das gesamte während des Versuchs zu verfütternde Heu vor Beginn desselben gehäckselt, sorgfältig durcheinander gemischt und sofort in die einzelnen Tagesrationen abgewogen, um dadurch eine möglichst gleichmäßige Zu-

---

[1]) *Hansen*, Landwirtschaftl. Jahrbüch. **57**, 142, 1922.
[2]) *Pfeiffer*, Fühlings landwirtschaftl. Zeitung **71**, 313, 1922.
[3]) *Ungerer*, diese Zeitschr. **147**, 275, 1924.

sammensetzung derselben zu erzielen. Auch die anderen Futtermittel wurden nach Möglichkeit vorher in Menge des gesamten Bedarfs besorgt und durch öftere Probeuntersuchungen auf die Konstanz des Nährstoffgehalts geprüft. Beigefuttert wurden während der Versuchsdauer je Tag und Kopf 15 g Kochsalz und 5 g phosphorsaurer Kalk.

Der Versuch umfaßte vier Ersatzfutterperioden, in denen Eiweiß ersetzt wurde durch: Ammoniumacetat, Harnstoff oder Hornmehl (Ovagsolan). Je zwei Ersatzperioden wurden von Grundfutterperioden umschlossen, um den natürlichen Verlauf der Lactation verfolgen zu können; es reihten mithin aneinander an:

I.	Grundfutterperiode vom 19. Mai bis 7. Juni	=	20 Tage
I.	Ersatzperiode vom 8. bis 27. Juni	=	20 „
II.	Ersatzperiode vom 28. Juni bis 17. Juli	=	20 „
II.	Grundfutterperiode vom 18. Juli bis 8. August . . .	=	22 „
III.	Ersatzperiode vom 9. bis 28. August	=	20 „
IV.	Ersatzperiode vom 29. August bis 14. September . .	=	17 „
III.	Grundfutterperiode vom 15. bis 30. September . . .	=	16 „

Die vierte Ersatzperiode (Hornmehl) mußte wider Willen etwas vor der Zeit abgebrochen werden, da das Hornmehl ausging und neues nicht zu beschaffen war. Die dritte Grundfutterperiode zeigte in der letzten Zeit stets gleiche Kot- und Harnzusammensetzung, so daß kein Grund vorlag, hier bei dieser Schlußperiode die 3 Wochen genau inne zu halten. Die ersten 7 Tage jeder Periode rechnen als Übergangszeit nicht zu der eigentlichen Periode mit; in den am Schluß zusammengefaßten Tabellen sind sie daher durch einen Strich von diesen engeren Zeiträumen getrennt. Das Mittel jeder Periode bezieht sich immer nur auf die engeren 14 Tage.

Futterzusammensetzung

a) der Grundperioden.

In den Grundfutterperioden erhielten die Ziegen je Kopf und Tag:

150 g	Trockenhefe,	als warme Tränke zur Hälfte des Morgens, zur Hälfte des Abends, vor der Heugabe
200 g	Kleie,	
100 g	Leinkuchen,	
50 g	Zucker,	
200 g	Hafer	geschrotet, zur Hälfte morgens, zur Hälfte abends, während des Melkens.
1000 g	Heu,	in drei gleichen Teilen morgens, mittags und abends vorgelegt.

Die Trockenhefe, die ursprünglich allein ersetzt werden sollte, wurde des geringen Amidgehaltes wegen gewählt.

Da Ziege 1 nur sehr wählerisch fraß, wurde die Heumenge für sie zu Beginn der ersten Ersatzperiode von 1000 auf 800 g reduziert.

Die prozentische Zusammensetzung der Futtermittel betrug nach eigener Untersuchung:

	Trocken-substanz	Organische Substanz	Rohprotein	Reinprotein	Verdauliche N-Substanz*)	Rohfett	N-freie Extrakt-stoffe	Rohfaser	Asche
Trockenhefe	92,0	84,0	48,0	34 5	41,5	1,2	34,3	0,5	8,0
Kleie	88,6	83,6	14,2	12,2	12,5	3,9	56,8	8,7	5,0
Leinkuchen .	91,6	84,7	29,7	28,2	26,6	8,0	38,0	9,0	6,9
Zucker . . .	99,9	99,8	—	—	—	—	99,8	—	0,1
Hafer . . .	87,0	84,0	12,2	11,0	11,2	4,5	54,9	12,4	3,0
Heu	86,4	80,8	9,2	8,7	3,7	2,6	38,3	30,7	5,6

*) Nach *Stutzer*.

Die Ziegen erhielten mithin an Nährstoffen in der ersten Grundfutterperiode verabfolgt:

	Trocken-substanz	Organische Substanz	Rohprotein	Reinprotein	Rohfett	N-freie Extrakt-stoffe	Rohfaser	Asche	Z
Trockenhefe	138,0	126,0	72,0	51,8	1,8	51,5	0,8	12,0	11,5
Kleie	177,2	167,2	28,4	24,4	7,8	113,6	17,4	10,0	4,5
Leinkuchen .	91,6	84,7	29,7	28,2	8,0	38,0	9,0	6,9	4,8
Zucker . . .	49,9	49,8	—	—	—	49,8	—	0,1	—
Hafer . . .	174,0	168,0	24,4	22,0	8,9	109,9	24,8	6,0	3,9
Heu	864,0	808,0	91,9	87,0	26,0	383,1	307,0	56,0	14,7
Salze . . .	13,0	—	—	—	—	—	—	13,0	—
Zusammen .	1507,7	1403,7	246,4	213,4	52,5	745,9	359,0	104,0	39,4

Da der Vorrat an Kleie zu Ende der zweiten Ersatzperiode ausging, mußte neue beschafft werden, deren Analysenergebnisse:

	Trocken-substanz	Organische Substanz	Rohprotein	Reinprotein	Verdauliche N-Substanz	Rohfett	N-freie Extrakt-stoffe	Rohfaser	Asche	Z
Kleie	89,0	82,9	13,2	11,2	11,0	3,8	56,3	9,6	6,1	2,1

die Futterzusammensetzung für die zweite und dritte Grundfutterperiode nur leicht abänderten, nämlich:

	Trocken-substanz	Organische Substanz	Rohprotein	Reinprotein	Rohfett	N-freie Extrakt-stoffe	Rohfaser	Asche	Z
Ziege 2, 3, 4	1508,6	1402,4	244,5	211,4	52,3	744,8	360,8	106,2	39,1
Ziege 1*) (200 g Heu weniger) .	1335,8	1240,8	226,1	194,0	47,1	668,2	299,4	95,0	36,2

*) Von Beginn der ersten Ersatzperiode an, wie schon erwähnt.

Die Berechnung des verdaulichen Eiweißes und des Stärkewertes des gereichten Futters erfolgte zunächst durch Anwendung der *Kellner*schen

Verdauungskoeffizienten auf die Analysenresultate der Futtermittel und ergab für diese in Prozenten an verdaulichen Nährstoffen:

Proz.	Verdauliches Eiweiß	Verdauliches Fett	Verdauliche Kohlenhydrate	Verdauliche Rohfaser	Wertigkeit des Futtermittels	Errechneter Stärkewert
Trockenhefe .	38,2	0,7	34,3	—	100,0	71,8
Kleie 1 . . .	9,0	3,1	45,4	1,7	79,0	49,1
Leinkuchen .	24,0	7,3	29,6	2,9	97,0	70,6
Hafer	8,8	3,6	41,8	3,5	95,0	58,0
Heu	3,2	1,3	22,6	16,9	60,0	27,1
Zucker	—	—	99,8	—	76,0	75,9
Kleie 2 . . .	8,3	3,0	45,0	1,9	79,0	49,4

Verdauliches Eiweiß und Stärkewert der Futtermittel errechnen sich mithin auf:

	Verdauliches Eiweiß g	Stärkewert g
Trockenhefe	57,3	107,7
Kleie	18,0	98,2
Leinkuchen	24,0	70,6
Hafer	17,6	116,0
Heu	31,9	270,9
Zucker	—	38,0
Tägliche Futterration bei Ziege 2, 3, 4 . .	148,7	701,4
Tägliche Futterration bei Ziege 1	142,5	647,2

Bei der Kleie II ändert sich der Stärkewert, wie oben ersichtlich, nur ganz unbedeutend.

b) Futterzusammensetzung der Ersatzperioden.

Von dem auf diese Weise vorläufig gefundenen verdaulichen Eiweiß wurde ersetzt in:

Ersatzperiode I: 21 Proz. = 31,25 g verdauliches Eiweiß mit 5 g N in Form von 82 g Trockenhefe durch 40 g Ammoniumacetat, 12,5proz. mit 5 g N.

Ersatzperiode II: 50,33 Proz. = 74,87 g verdauliches Eiweiß mit 11,98 g N in Form von 150 g Trockenhefe + 200 g Hafer durch 95,8 g Ammoniumacetat derselben Beschaffenheit wie in der ersten Ersatzperiode mit 11,98 g N.

Ersatzperiode III: 50,33 Proz. in derselben Form durch 26 g Harnstoff, 46proz., mit 11,98 g N.

Ersatzperiode IV: 50,33 Proz. in derselben Form durch 330,9 g Hornmehl mit 11,98 g N in 11,98 . 6,25 g verdaulicher N-Substanz.

Das bei diesem Versuch benutzte Hornmehl, sogenanntes Ovagsolan, unterscheidet sich vom voll aufgeschlossenen Hornmehl durch eine

weniger weit reichende Reinigung von gleichgültigen Nebensubstanzen, einen weniger weit reichenden Grad der Aufschließung und einen Zusatz von Heidekrautmehl; daraus erklärt sich seine Zusammensetzung:

	Trockensubstanz	Organische Substanz	Rohprotein	Reinprotein *)	Verdauliche N-Substanz	Rohfett	N-freie Extraktstoffe	Rohfaser	Asche	N
In Proz. . .	91,5	78,4	41,2	30,5	22,6	4,2	19,3	13,6	13,1	6,6
In 330,94 g .	303,0	259,4	136,5	101,1	74,8	13,9	63,9	45,1	43,6	21,8

*) D. h. hier Leimsubstanz, oder jedenfalls Hornmasse.

Alle folgenden Tabellen enthalten in der Spalte „Rohprotein" Zahlen, die durch Multiplikation der gesamten N-Menge mit 6,25 entstehen, trotzdem der Stickstoff in den N-Salzen vielfach in einem anderen Verhältnis an die organische Substanz gebunden ist; doch wurde dieses Verfahren gewählt, um das Rohprotein des Kotes mit dem des Futters in Beziehung setzen zu können.

Um die Wirkung des Ersatzes von verdaulichem Eiweiß durch N-Salze klar erkennen zu können, mußte der ausgefallene Stärkewert in voller Höhe durch Zucker ersetzt werden, so daß das Mehr an Zucker in den einzelnen Ersatzperioden sich belief auf:

Ersatzperiode I . . . . 80 g
„ II . . . . 300 g
„ III . . . . 300 g
„ IV . . . . 300 g

Diese Ausführungen erklären die *Futterzusammensetzung der*

I. Ersatzperiode.

Schwache Ammoniumacetatgabe. Ein Teil der Trockenhefe fällt weg. Ersatz durch Ammoniumacetat.

	Trockensubstanz	Organische Substanz	Rohprotein	Reinprotein	Rohfett	N-freie Extraktstoffe	Rohfaser	Asche	N
68 g Trockenhefe .	62,5	57,1	32,6	23,4	0,8	23,3	0,3	5,4	5,2
200 g Kleie	177,2	167,2	28,4	24,4	7,8	113,6	17,4	10,0	4,5
100 g Leinkuchen .	91,6	84,7	29,8	28,2	8,0	37,9	9,0	6,9	4,8
200 g Hafer	174,0	168,0	24,4	22,0	8,9	109,9	24,8	6,0	3,9
100 g Heu	864,0	808,0	91,9	87,0	26,0	383,1	307,0	56,0	14,7
130 g Zucker *) . . .	129,9	129,7	—	—	—	129,7	—	0,2	—
13 g Salze	13,0	—	—	—	—	—	—	13,0	—
40 g Amm. Acet. .	39,8	39,8	31,2	—	—	—	—	—	5,0
Tägl. Futterration f. Ziege 2, 3, 4	1552,0	1454,5	238,3	185,0	51,5	797,5	385,5	97,5	38,1
Tägl. Futterration f. Ziege 1, weniger 200 g Heu . . .	1379,2	1292,9	219,9	167,6	46,3	720,9	297,1	86,3	35,2

*) Die Aschenmenge des Zuckers ist zwar sehr gering, aber doch nicht = 0, etwa 0,1 bis 0,2 Proz.

II. Ersatzperiode.

Ersatz durch Ammoniumacetat (starke Ammoniumacetatperiode). Trockenhefe und Hafer fallen fort.

	Trockensubstanz	Organische Substanz	Rohprotein	Reinprotein	Rohfett	N-freie Extraktstoffe	Rohfaser	Asche	N
200 g Kleie	177,2	167,2	28,4	24,4	7,8	113,6	17,4	10,0	4,5
100 g Leinkuchen .	91,6	84,7	29,7	28,2	8,0	38,0	9,0	6,9	4,8
1000 g Heu	864,0	808,0	91,9	87,0	26,0	383,1	307,0	56,0	14,7
13 g Salze	13,0	—	—	—	—	—	—	13,0	—
350 g Zucker . . .	349,6	349,2	—	—	—	349,2	—	0,4	—
95,84 g Amm. Acet.	95,3	95,3	74,9	—	—	—	—	—	2,0
Tägl. Futterration f. Ziege 2, 3, 4	1590,7	1504,4	224,9	139,6	41,8	883,9	333,4	86,3	36,0
Tägl. Futterration f. Ziege 1	1417,9	1342,8	206,5	122,2	36,6	807,3	272,0	75,1	33,0

III. Ersatzperiode.

Ersatz durch Harnstoff. Dieselbe Futterzusammensetzung wie in der zweiten Ersatzperiode. An Stelle von Ammoniumacetat *Harnstoff* (26,04 g).

	Trockensubstanz	Organische Substanz	Rohprotein	Reinprotein	Rohfett	N-freie Extraktstoffe	Rohfaser	Asche	N
Tägl. Futterration f. Ziege 1 .	1349,4	1272,1	204,5	120,2	36,4	806,4	273,8	77,3	32,7
Tägl. Futterration f. Ziege 2, 3, 4	1522,2	1433,7	222,9	137,6	41,6	882,9	335,2	88,5	35,7

IV. Ersatzperiode.

Dieselbe Futterzusammensetzung der dritten Ersatzperiode. An Stelle von Harnstoff 330,9 g *Hornmehl,* mithin Summe der *Nährstoffe der vierten Ersatzperiode*:

	Trockensubstanz	Organische Substanz	Rohprotein	Reinprotein	Rohfett	N-freie Extraktstoffe	Rohfaser	Asche	N
Für Ziege 2, 3, 4	1799,2	1667,1	284,6	238,7	55,5	946,8	380,3	132,1	45,5
Für Ziege 1.	1626,4	1505,5	266,2	221,3	50,3	870,1	318,9	120,9	42,6

Die Ziegen fraßen das Futter restlos bis auf unbedeutende Heurückstände, die zurückgewogen und analysiert wurden, um sie bei der Berechnung berücksichtigen zu können. Diese Heureste betrugen im Durchschnitt je Tag (in Grammen angegeben):

	Grundperiode I	Ersatzperiode I	Ersatzperiode II	Grundperiode II	Ersatzperiode III	Ersatzperiode IV	Grundperiode III
Bei Ziege 1 . .	40	10	50	30	15	50	10
„ „ 2 . .	10	10	15	10	30	30	10
„ „ 3 . .	10	10	30	10	30	70	10
„ „ 4 . .	10	10	30	10	20	100	10

Die Futterwerte, die den anschließenden Tabellen über die Ausnutzungsversuche der verschiedenen Rationen und über die Verdaulichkeit des Gesamtfutters zugrunde liegen, berücksichtigen bereits diese Futterreste und unterscheiden sich daher um diesen Betrag von den früher aufgestellten Futterplänen.

Es sei an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, daß zunächst nach den *Kellner*schen Verdauungskoeffizienten und den Futteranalysen der Nährstoffwert bestimmt wurde, aus dem sich für die Grundfutterperioden eine Höhe von: 148,7 g verdaulichem Eiweiß und 701,4 g Stärkewert ergab. Da in den Ersatzfutterperioden nur verdauliches Eiweiß ersetzt, die Stärkewertmenge dagegen durch Zufütterung von Zucker beibehalten wurde, erfuhr das Eiweißverhältnis beträchtliche Erweiterungen.

	Verdauliches Eiweiß	Stärkewert	Eiweißverhältnis
Grundperiode I, II, III	148	701	1 : 5,2
Ersatzperiode I	117,5	701	1 : 6,5
Ersatzperiode II, III, IV	73,9	701	1 : 10,9

Für Ziege 1: Eiweißverhältnis = 4,8 bzw. 6,1 und 10,6. Dagegen bleibt das Verhältnis von verdaulichem Gesamtprotein zu den verdaulichen stickstofffreien Stoffen, also das „Nährstoffverhältnis", wie aus dem Texte schon hervorgeht, nahezu unverändert, es beträgt nämlich für die

Ziegen 2, 3, 4:

in den Grundfutterperioden	. . . . .	1 : 4,50
„ Ersatzperiode	I	1 : 4,50
„ „	II	1 : 4,90
„ „	III	1 : 4,90
„ „	IV	1 : 4,90

Ziege 1:

Grundperiode	I	1 : 4,5
„	II und III	1 : 4,0
Etsatzperiode	I	1 : 4,2
„	II	1 : 4,6
„	III	1 : 4,6
„	IV	1 : 4,6

Aufnahme des Futters und Wirkung auf den Gesundheitszustand.

Die Grundperioden verliefen ohne jede Störung. Die schwache Ammoniumacetatperiode (I. Ersatzperiode) verursachte nach anfänglichem Widerstreben erhöhten Appetit und erregte bei Ziege 2 vorübergehend leichte Diurese. Dagegen verminderte die 50proz. Ammoniumacetatperiode die Freßlust bedeutend, wenn auch über Nacht die gereichten Futtergaben aufgefressen wurden. Während aber in der schwachen Ersatzperiode die Ziegen 2, 3 und 4 das N-Salz auf dem Heu erhielten, konnte es in der starken Ersatzperiode nur mehr zur Hälfte dem Heu und mußte zur anderen Hälfte

der Tränke beigegeben werden, um dadurch das Zurückweisen der Heuration, wahrscheinlich infolge zu scharfen und sauren Geruchs und Geschmacks, zu vermeiden. Für die Ziegen 1 und 5 wurde das Ammoniumacetat von vornherein schon bei der schwachen Periode ganz der Tränke zugesetzt, da bei ihnen infolge geringen Appetits sonst die Gefahr eines unvollkommenen Verzehrs bestanden hätte. Das Futter rief bei den Ziegen 2 und 4 während der ganzen Zeit eine starke Diurese hervor, die Veranlassung dazu geben mußte, sie auf das sorgfältigste dauernd zu beobachten. Ziege 5 schied am neunten Tage aus dem Versuch ganz aus und erhielt Grundfutter infolge starker Erkrankung durch Verstopfung. Es sei darauf hingewiesen, daß bei den vorjährigen Arbeiten von *Ungerer* aus dem hiesigen agrikulturchemischen Institut ebenfalls eine Zunahme des prozentischen Kottrockensubstanzgehalts zu verzeichnen war. Während der Harnstoffperiode konnten die Ziegen 2, 3, 4 diese Beigabe wieder voll auf dem Heu erhalten. Das Hornmehl bekamen die Ziegen in der Tränke. Diese wurde zunächst von allen hartnäckig zurückgewiesen, doch gewöhnten sie sich schon am dritten Tage an das ungewohnte Futter und fraßen es restlos auf. Verdauungsstörungen wurden nicht beobachtet.

So gute Erfolge auch das Ammoniumacetat zeitigte, so dürfte doch seine zulässige Höchstmenge gegeben worden sein, wenn nicht ernstere Erkrankungen durch Verstopfung befürchtet werden sollten.

Es fällt in der starken Ammoniumacetatperiode ferner ein stärkeres Wiederkäuen und ein häufigeres Liegen aller Ziegen auf, doch scheint die Ursache hierzu nicht in einem Gefühl des Unwohlseins, sondern vielmehr der Sättigung zu liegen, worauf die Körpergewichtszunahme und das sonst muntere Bewegen der Tiere schließen lassen.

Auch für Hornmehl erscheint eine stärkere Gabe nicht ratsam.

Ausnutzungsversuche mit den verschiedenen Rationen. Verdaulichkeit der Futtermittel.

Um nun die Menge der wirklich verdauten Nährstoffe und aus ihnen die Verdauungskoeffizienten des Gesamtfutters der Grund- und Ersatzperioden, ferner den tatsächlich gefütterten Stärkewert bestimmen zu können, die ja zusammen das beste Licht auf den Wert der Ersatzfutterperioden und damit der N-Salze zu werfen vermögen, dienen nachstehende Tabellen, die auf die übliche Weise durch Differenz der Futter- und Kotbestandteile die verdaute Substanz und die Verdauungskoeffizienten berechnen.

Der Kot enthält nun jedoch stets neben den Rückständen der aufgenommenen Nahrung in geringerer Menge insbesondere N-haltige, sogenannte Stoffwechselprodukte, die aus dem Körper stammen und somit von dem Kot-N abgezogen werden müssen, um den genauen Umfang der Verdauung zutage treten zu lassen. Man rechnet aus Versuchen von *Pfeiffer* in der Regel damit, daß die N-Stoffwechselprodukte im Kote voll durch das *Stutzer*sche Verfahren der künstlichen Verdauung mit Pepsin-HCl gelöst und verdaut werden, so daß man auf diesem Wege die N-Stoffwechselprodukte von der unverdauten Kot-N-Substanz trennen und durch Abzug der letzteren von der verfütterten N-Substanzmenge die wirklich verdaute N-Substanz feststellen kann. Man ermittelt ferner durch Analyse den Gehalt des Kotes nicht nur an Rohprotein, sondern auch an Reinprotein;

auf diese Weise erklären sich die Berechnungen der Verdauungskoeffizienten der N-Substanzen in den folgenden Zusammenstellungen. Der Verdauungskoeffizient der ersten Längsspalte ist berechnet aus der Differenz des Futterrohproteins und des gesamten Kotproteins, der der zweiten Spalte aus der Differenz des Futterreinproteins und Kotreinproteins, diejenigen der dritten und vierten Spalte aus der Differenz des Futterroh- bzw. -reinproteins und der Pepsin-HCl unlöslichen Kot-N-Substanz, die für beide Spalten (Roh- und Reinprotein) aber deshalb die gleiche sein muß, weil im Kote unter normalen Verhältnissen nur unverdauliches Futtereiweiß, niemals Amide vorhanden sein können; letztere aber bilden den Unterschied zwischen Roh- und Reinprotein.

Ein Vergleich dieser Verdauungskoeffizienten zeigt bemerkenswerte Unterschiede, die eine eingehendere Erörterung verdienen. Der Ersatz von Trockenhefe + Hafer, wenn auch hochverdaulichen Nährstoffen, durch leicht lösliche Amide und Kohlenhydrate in den Ersatzperioden II und III muß fraglos zu höherer Verdaulichkeit der gesamten Trocken- und organischen Substanz und in noch stark gesteigertem Umfang der Kohlenhydrate führen. Die Bakterien, denen zur Entwicklung leicht lösliche Kohlenhydrate in den Ersatzperioden reichlich zur Verfügung stehen, zerstören infolgedessen in geringerem Maße die Rohfaser, so daß deren Verdaulichkeit sinkt. Da die ersetzten Futtermittel das Reinprotein in leicht verdaulichem Zustand enthielten, die nicht ersetzten dagegen überwiegend (Heu) in schwer, zum Teil unverdaulichem, muß normalerweise in den Ersatzperioden der Verdauungskoeffizient des Reineiweißes, berechnet sowohl aus dem Gesamteiweiß wie aus dem in Pepsin-HCl unlöslichen Eiweiß, unbedingt sinken. Im Rohprotein dagegen dürfte dieses Fallen durch eine erhöhte Resorption der löslichen N-Salze aufgehoben werden. So ergibt sich aus diesen Überlegungen ein Bild, das den tatsächlichen Verhältnissen durchaus entspricht. Unterwerfen wir nun noch die im Kote ausgeschiedenen, in Pepsin-Salzsäure unlöslichen Eiweißmengen einem Vergleich, so zeigt sich, daß in den Ersatzperioden etwas weniger Eiweiß ausgeschieden wird als in den Grundperioden, verständlich in Anbetracht des Umstandes, daß auch mit Hafer + Trockenhefe unverdauliches Eiweiß entzogen wird. Wenn eine Bildung von unverdaulichem Bakterieneiweiß stattgefunden hätte, hätte eine erhöhte Eiweißmenge im Kote gefunden werden müssen[1]). Dagegen scheint eine erhöhte Ausscheidung von Stoffwechselprodukten in Frage zu kommen, da die verdaute N-Substanz sich verringert, anstatt auf derselben Höhe zu bleiben, eine Tatsache, die sich im leichten Sinken des Verdauungskoeffizienten äußert. Die Verdauungskoeffizienten der ersten Ersatzfutterperiode liegen im allgemeinen zwischen denen der ersten Grund- und der zweiten Ersatzperiode. Die vierte Ersatz-

[1]) *Morgen*, Die landwirtschaftl. Versuchsstationen **73**, 289, 1910.

Ausnutzungsversuche mit den verschiedenen Rationen. Verdaulichkeit des Gesamtfutters.

	Ziege	Aus Gesamt-N des Kotes		Aus Pepsin-HCl-unlösl. N des Kotes		N	Fett	Rohfaser	N-freie Extraktstoffe	Organische Substanz	Trockensubstanz
		Rohprotein	Reinprotein	Rohprotein	Reinprotein						
I. Grundperiode.											
Futterwert . . .	1	242,8	209,9	242,8	209,9	38,8	51,5	346,7	730,6	1371,5	1473,1
	2	245,5	212,5	245,5	212,5	39,3	52,2	355,9	742,1	1395,7	1499,1
	3	245,5	212,5	245,5	212,5	39,3	52,2	355,9	742,1	1395,7	1499,1
	4	245,5	212,5	245,5	212,5	39,3	52,2	355,9	742,1	1395,7	1499,1
Im Kote	1	63,8	57,2	44,7	44,7	10,2	15,1	141,2	220,5	440,6	522,1
	2	70,8	63,0	50,1	50,1	11,3	15,8	164,0	241,5	492,1	583,6
	3	73,2	62,6	48,4	48,4	11,7	16,4	147,1	237,2	474,0	571,3
	4	67,2	59,7	45,2	45,2	11,0	16,0	157,5	236,4	477,0	566,4
Verdaut vom Gesamtfutter . .	1	179,0	152,7	198,1	165,2	28,6	36,4	205,5	510,1	930,9	951,0
	2	174,7	149,5	195,4	162,4	28,0	36,4	191,9	500,6	903,6	915,4
	3	172,3	149,9	197,1	164,0	27,5	35,9	208,8	504,9	921,7	927,7
	4	178,3	152,8	200,3	167,4	28,2	36,2	198,4	504,7	918,7	932,6
Verdauungskoeffizient	1	73,7	71,1	81,6	73,4	73,9	70,6	59,3	69,8	67,9	64,6
	2	71,2	70,3	79,6	76,4	71,2	69,8	53,9	67,5	64,8	61,1
	3	70,2	70,5	80,3	77,2	70,1	68,7	58,7	68,0	66,1	61,9
	4	72,6	71,9	81,6	78,7	71,9	69,4	55,8	68,0	65,8	62,2
I. Ersatzperiode etwa 14 Proz. Ammoniumacetat.											
Futterwert . . .	1	219,0	166,8	219,0	166,8	35,0	46,0	294,0	731,6	1284,7	1370,6
	2	237,4	184,2	237,4	184,2	38,0	51,2	355,4	793,7	1446,3	1543,4
	3	237,4	184,2	237,4	184,2	38,0	51,2	355,4	793,7	1446,3	1543,4
	4	237,4	184,2	237,4	184,2	38,0	51,2	355,4	793,7	1446,3	1543,4
Im Kote	1	59,5	50,6	38,8	38,8	9,5	13,9	155,0	182,4	410,9	482,6
	2	67,6	58,3	41,0	41,0	10,8	12,9	182,0	220,8	483,3	566,7
	3	70,9	61,0	45,2	45,2	11,3	15,5	175,3	235,8	497,4	586,9
	4	67,7	57,3	44,5	44,5	10,8	16,9	168,5	236,4	488,5	576,6
Verdaut	1	159,5	116,2	180,2	128,0	25,5	32,1	139,0	549,2	873,8	888,0
	2	169,8	125,9	196,4	143,2	27,2	38,3	173,4	572,9	963,0	976,7
	3	166,3	123,2	192,2	139,0	26,6	35,7	180,1	557,9	948,9	956,5
	4	169,7	126,9	192,9	139,7	27,2	35,3	186,9	557,3	957,8	966,8
Verdauungskoeffizient	1	72,8	69,6	82,3	76,8	73,0	69,7	47,3	75,1	68,0	64,8
	2	71,5	68,3	82,8	77,8	71,5	74,9	48,8	72,2	66,6	63,3
	3	70,1	66,9	81,0	75,5	70,1	69,8	50,7	70,3	65,5	62,0
	4	71,5	68,9	81,3	75,8	71,5	68,9	52,6	70,2	66,2	62,6

	Ziege	Aus Gesamt-N des Kotes		Aus Pepsin-HCl-unlösl. N des Kotes		N	Fett	Rohfaser	N-freie Extraktstoffe	Organische Substanz	Trockensubstanz
		Rohprotein	Reinprotein	Rohprotein	Reinprotein						
II. Ersatzperiode (etwa 50 Proz. Ammoniumacetat).											
Futterwert . . .	1	201,9	117,8	201,9	117,8	32,3	35,3	256,6	788,1	1302,4	1374,7
	2	223,5	138,2	223,5	138,3	35,8	41,4	328,8	878,1	1492,3	1577,8
	3	222,2	137,0	222,2	137,0	35,5	41,1	324,2	872,4	1480,2	1564,9
	4	222,2	137,0	222,2	137,0	35,5	41,1	324,2	872,4	1480,2	1564,9
Im Kote	1	61,7	54,0	39,5	39,5	9,9	12,9	147,0	197,5	419,1	483,6
	2	72,4	68,6	48,7	48,7	11,6	14,8	178,6	248,6	514,2	596,0
	3	68,2	59,1	43,0	43,0	10,9	12,5	164,8	228,8	474,4	549,7
	4	73,2	67,3	49,6	49,6	11,7	14,9	174,5	259,5	521,1	603,0
Verdaut	1	140,2	63,8	162,4	78,3	22,4	22,4	109,6	590,6	883,3	891,1
	2	151,1	69,7	174,8	89,6	24,2	26,6	150,5	629,5	978,1	981,7
	3	153,9	77,9	179,2	93,9	24,6	28,5	159,4	643,6	1005,8	1015,1
	4	149,1	69,6	172,6	87,4	23,8	26,2	149,7	612,9	959,1	961,8
Verdauungskoeffizient	1	69,4	54,1	80,4	66,5	69,4	63,4	42,7	75,0	67,8	64,8
	2	67,5	50,4	78,2	64,8	67,6	64,2	45,8	71,7	65,6	62,2
	3	69,2	56,8	80,6	68,6	69,2	69,5	49,2	73,8	67,9	64,9
	4	67,1	50,8	77,7	63,8	67,1	63,8	46,2	70,3	64,8	61,5
II. Grundperiode.											
Futterwert . . .	1	223,3	191,4	223,3	191,4	35,7	46,3	290,2	656,8	1216,7	1309,9
	2	243,6	210,5	243,5	210,5	38,9	52,0	357,7	741,1	1394,4	1500,0
	3	243,6	210,5	243,5	210,5	38,9	52,0	357,7	741,1	1394,4	1500,0
	4	243,6	210,5	243,5	210,5	38,9	52,0	357,7	741,1	1394,4	1500,0
Im Kote	1	51,5	44,5	38,0	38,0	8,3	10,3	112,9	193,9	363,6	436,5
	2	70,5	60,7	49,4	49,4	11,3	15,4	171,2	239,7	496,9	586,2
	3	83,1	72,4	55,8	55,8	13,3	18,0	178,8	273,9	553,7	656,8
	4	64,2	55,9	44,6	44,6	10,3	12,1	163,8	210,3	450,4	534,6
Verdaut	1	171,8	146,9	185,3	153,3	27,5	36,0	177,3	462,9	848,1	873,4
	2	173,0	149,8	194,1	161,1	27,6	36,6	186,5	501,4	897,5	913,8
	3	160,5	138,1	187,7	154,7	25,6	34,0	178,9	467,2	840,7	843,2
	4	179,4	154,6	198,9	165,9	28,6	39,9	193,9	530,8	944,0	965,4
Verdauungskoeffizient	1	76,9	76,8	83,0	80,1	76,9	77,8	61,1	70,5	69,7	66,7
	2	71,1	71,2	79,7	76,5	71,0	70,3	52,1	67,7	64,4	61,0
	3	65,9	65,6	78,9	73,5	66,0	65,4	50,0	63,0	60,3	56,2
	4	73,7	73,5	81,7	78,8	73,7	76,8	54,2	71,6	67,7	64,4

	Ziege	Aus Gesamt-N des Kotes		Aus Pepsin-HCl-unlösl. N des Kotes		N	Fett	Rohfaser	N-freie Extraktstoffe	Organische Substanz	Trockensubstanz
		Rohprotein	Reinprotein	Rohprotein	Reinprotein						
III. Ersatzperiode (etwa 50 Proz. Harnstoff).											
Futterwert . . .	1	203,2	118,9	203,2	118,9	32,5	36,0	269,2	800,5	1260,0	1336,5
	2	220,2	135,0	220,2	135,0	35,2	40,8	326,0	871,4	1409,5	1496,3
	3	220,2	135,0	220,2	135,0	35,2	40,8	326,0	871,4	1409,5	1496,3
	4	221,1	135,9	221,1	135,9	35,4	41,1	329,1	875,2	1417,6	1504,9
Im Kote	1	52,0	47,8	38,6	38,6	8,2	10,1	116,2	194,5	372,0	431,1
	2	61,2	58,6	43,0	43,0	9,8	12,1	145,6	246,5	464,2	535,8
	3	66,7	63,6	47,3	47,3	10,8	11,3	145,9	244,1	468,0	543,6
	4	60,7	56,1	39,9	39,9	9,7	13,6	146,8	235,6	456,8	529,3
Verdaut	1	151,2	71,1	164,6	80,3	24,3	25,9	153,0	606,0	888,0	905,4
	2	159,0	76,4	177,2	92,0	25,4	28,7	180,4	624,9	945,3	960,5
	3	153,5	71,4	172,9	87,7	24,4	29,5	180,1	627,3	941,5	952,7
	4	160,4	79,8	181,2	96,0	25,6	27,5	182,2	639,6	960,8	975,7
Verdauungskoeffizient	1	74,8	59,6	81,0	67,5	74,8	72,1	56,8	75,7	70,5	67,7
	2	72,2	56,6	80,5	68,2	72,1	70,5	55,3	71,7	67,2	64,2
	3	69,3	52,9	78,5	65,0	69,4	72,2	55,3	72,0	67,1	63,7
	4	72,5	58,9	81,9	70,5	72,5	66,9	55,4	73,1	67,8	64,8
IV. Ersatzperiode (etwa 50 Proz. Hornmehl).											
Futterwert . . .	1	261,6	216,9	261,6	216,9	41,8	49,0	303,6	851,0	1465,1	1583,2
	2	281,8	236,1	281,8	236,1	45,1	54,7	371,1	935,3	1643,0	1773,3
	3	278,1	232,6	278,1	232,6	44,5	53,7	358,8	920,0	1610,6	1738,8
	4	275,4	230,0	275,4	230,0	44,0	52,9	349,6	908,4	1586,6	1712,8
Im Kote	1	104,6	93,2	69,7	69,7	16,7	26,3	184,3	246,5	561,7	642,8
	2	111,6	99,8	70,5	70,4	17,9	26,8	212,6	288,7	639,7	731,4
	3	118,2	100,9	69,2	69,2	18,9	29,1	185,0	277,5	609,9	698,0
	4	116,9	103,3	73,3	73,3	18,7	30,5	196,7	283,9	628,0	714,7
Verdaut	1	157,0	123,7	191,9	147,2	25,1	22,7	119,3	604,5	903,4	940,4
	2	170,2	136,3	211,3	165,7	27,2	27,9	158,5	646,6	1003,3	1041,9
	3	159,9	131,7	208,9	163,4	25,6	24,6	173,8	642,5	1000,7	1040,8
	4	158,5	126,7	202,1	156,7	25,3	22,4	152,9	624,5	958,6	998,1
Verdauungskoeffizient	1	60,0	59,8	73,4	67,9	60,0	46,3	39,3	71,1	61,6	59,4
	2	60,3	57,7	75,0	70,2	61,3	51,0	42,7	69,2	61,1	58,7
	3	57,5	56,6	75,1	70,3	57,5	45,8	48,4	69,9	62,1	61,3
	4	57,6	55,1	73,4	69,7	57,6	42,3	43,7	68,8	60,4	58,3

	Ziege	Aus Gesamt-N des Kotes		Aus Pepsin-HCl-unlösl. N des Kotes		N	Fett	Rohfaser	N-freie Extraktstoffe	Organische Substanz	Trockensubstanz
		Rohprotein	Reinprotein	Rohprotein	Reinprotein						
III. Grundperiode.											
Futterwert	1	225,2	193,1	225,2	193,1	36,0	46,8	296,3	664,5	1232,8	1327,2
	2	243,5	210,5	243,5	210,5	38,9	52,0	357,7	741,1	1394,4	1500,0
	3	243,5	210,5	243,5	210,5	38,9	52,0	357,7	741,1	1394,4	1500,0
	4	243,5	210,5	243,5	210,5	38,9	52,0	357,7	741,1	1394,4	1500,0
Im Kote	1	56,4	51,0	43,0	43,0	9,0	11,3	133,2	210,2	411,1	486,0
	2	68,1	62,7	49,3	49,3	10,9	16,1	164,9	251,6	500,8	593,5
	3	73,1	65,1	48,6	48,6	11,7	17,5	153,1	242,0	491,6	575,7
	4	63,1	59,6	45,1	45,1	10,1	18,3	147,1	241,7	470,2	560,0
Verdaut	1	168,8	142,1	182,2	150,1	27,0	35,5	163,1	454,3	821,7	841,2
	2	175,4	147,8	194,2	161,2	28,0	35,9	192,8	489,5	893,6	906,5
	3	170,4	145,4	194,9	161,9	27,2	34,5	204,6	499,1	902,8	924,7
	4	180,4	150,9	198,4	165,4	28,8	33,7	210,6	499,4	924,2	940,0
Verdauungskoeffizient	1	75,0	73,6	80,9	77,7	75,0	75,8	55,0	68,4	66,7	63,4
	2	72,0	70,2	79,7	76,6	72,0	69,0	53,9	66,1	64,1	60,4
	3	70,0	69,1	80,1	76,9	70,0	66,3	57,2	67,4	64,8	61,7
	4	74,1	71,7	81,5	78,6	74,1	64,9	58,9	67,4	66,3	62,7
Verhältnis der Verdauungskoeffizienten.											
Mittel der Grundperioden	1	75,2	73,8	81,8	77,1	75,3	74,7	58,5	69,6	68,1	64,9
	2	71,4	70,6	79,7	76,5	71,4	69,7	53,3	67,1	64,4	60,8
	3	68,7	68,4	79,7	75,9	68,7	66,8	55,3	66,1	63,7	59,9
	4	73,5	72,4	81,6	78,7	73,2	70,4	56,3	69,0	66,6	63,1
Durchschnitt		72,2	70,7	80,7	77,0	72,1	70,4	55,8	67,9	65,7	62,2
Durchschnitt der Ersatzperioden.											
I. Ersatzperiode		71,5	68,4	81,8	76,5	71,5	70,8	49,8	71,9	66,6	63,2
II. „		68,3	53,1	79,3	65,9	68,4	65,2	46,0	72,7	66,5	63,3
III. „		72,2	57,0	80,5	67,8	72,2	70,4	55,7	73,1	68,2	63,1
IV. „		58,8	57,3	74,2	69,5	59,0	46,4	43,1	69,7	61,3	59,4

periode weicht erheblich ab, da sie durchweg eine starke Depression zeigt. Begründet ist dieser Sturz durch die hohe Gabe an Hornmehl mit seinen schlecht oder gar nicht verdaulichen Bestandteilen. Die einzige Schwierigkeit liegt wohl in dem Abweichen der Verdauungskoeffizienten der zweiten und dritten Ersatzperioden voneinander (Ammoniumacetat und Harnstoff). Die Erklärung für die Depression der Acetat- gegenüber der Harnstoffperiode scheint in der verstärkt auftretenden, durch die Ammoniumacetatgaben verursachten Diurese der Ziegen zu suchen zu sein; diese Annahme wird dadurch verstärkt, daß bei den Ziegen 2 und 4, die besonders unter ihr zu leiden hatten, die Verdauungskoeffizienten gegenüber denen der zwei anderen in der Ammoniumacetatperiode sehr merkbar abfielen. Zusammenfassend kann man sagen: Es hat der Harnstoff gar nicht[1]), Ammoniumacetat nur wenig den Umfang der Verdauung herabgedrückt, wie die Verdauungskoeffizienten einwandfrei zeigen.

Berechnung der Stickstoffwechselprodukte.

Die Höhe der N-Stoffwechselprodukte wird als Differenz des Gesamtkotstickstoffs und des Pepsin-HCl-unlöslichen Kotstickstoffs bestimmt. Aus den Tabellen über die Ausnutzungsversuche geht hervor, daß die N-Ausscheidungen der Stoffwechselprodukte betragen (in Grammen N):

Für die Ziegen	1	2	3	4
In der I. Grundperiode	3,06	3,31	3,97	3,52
In der II. „	2,16	3,38	4,37	3,14
In der III. „	2,14	3,01	3,92	2,88
Im Mittel der Grundperioden . .	2,45	3,23	4,09	3,18
In der I. Ersatzperiode	3,31	4,26	4,11	3,71
In der II. „	3,55	4,79	4,03	3,78
In der III. „	2,14	2,91	3,10	3,33
In der IV. „	5,58	6,58	7,84	6,98

Auf 100 g verdauter organischer Substanz entfallen danach:

g N in den Stoffwechselprodukten:

Bei den Ziegen	1	2	3	4
Im Durchschn. d. Grundperioden	0,28	0,36	0,46	0,34
In der I. Ersatzperiode	0,38	0,44	0,43	0,39
In der II. „	0,40	0,39	0,40	0,39
In der III. „	0,24	0,31	0,33	0,35
In der IV. „	0,62	0,65	0,78	0,73

[1]) *Ungerer*, a. a. O.

Die Resultate stimmen mit den Angaben *Kellners*[1]), *Stutzers*[2]) und *Katayamas*[3]) überein, die auf Grund ihrer Versuche mit etwa 0,4 g N auf 100 g verdauter organischer Substanz rechnen. Allerdings ging man hierbei von der Annahme aus, daß die N-Stoffwechselprodukte vollkommen Pepsin-HCl-lösliche Substanz darstellen. Berücksichtigt man die Arbeiten *Morgens*[4]), dann hat man die gefundene N-Menge noch um etwa 33 Proz. zu erhöhen, entsprechend dem Pepsin-HCl-unlöslichen Anteil der N-Stoffwechselprodukte im Kote, um den richtigen Wert zu erhalten. Aus der vorstehenden Rechnung ergibt sich, daß die N-Stoffwechselprodukte in den Ersatzperioden II und III gar nicht oder nur wenig[5]), in Ersatzperiode IV beinahe um das Doppelte im Vergleich zur durchschnittlichen Menge während der Grundperiode erhöht sind. Die aus dem Vergleich der Verdauungskoeffizienten hervorgegangene Folgerung einer vermehrten Abgabe von N-Stoffwechselprodukten in den Ersatzperioden findet nun aber eine bessere Bestätigung für die zweite und dritte Ersatzperiode durch eine andere Berechnungsart; die N-Stoffwechselprodukte könnten auch als Differenz des Gesamtkotstickstoffs und des Pepsin-HCl-unlöslichen Futter-N bestimmt werden. Dieses Verfahren beruht auf dem Gedanken, daß die künstliche Pepsinverdauung der tatsächlichen des Tierversuchs genau entspricht, der Pepsin-HCl-unlösliche Futter-N also auch unverändert den Darm verläßt. Nach Versuchen *Morgens*[4]) kann aber „der pepsinunlösliche Stickstoff des Futters nicht unverändert durch den Tierkörper hindurchgehen, sondern es muß noch ein gewisser, oft gar nicht unbedeutender Teil desselben durch die Einwirkung der im Darme vorhandenen Verdauungssekrete gelöst werden". Und zwar dürften diese Unterschiede bei Rauhfutterstoffen und überhaupt schwer verdaulicher Substanz im allgemeinen größer sein. Die Pepsin-HCl-unlösliche N-Substanz des Futters beträgt nach dem *Stutzer*schen Verfahren für:

	In Proz.	Menge g
Trockenhefe	6,5	9,7
Kleie	1,7	3,4
Leimkuchen	3,15	3,15
Hafer	1,0	2,0
Heu	5,52	55,2
	Zusammen	73,5

[1]) *Kellner*, Biedermanns Zentralbl. f. Agrikulturchemie 1880, S. 763.
[2]) *Stutzer*, Journ. f. Landwirtschaft **28**, 195, 1881; **29**, 475, 1881.
[3]) *Katayama*, Die Landwirtschaftl. Versuchsstationen **69**, 321, 1908.
[4]) *Morgen*, ebendaselbst **85**, 1, 1914.
[5]) *Derselbe*, ebendaselbst **103**, 1, 1924.

Diese Zahl 73,5 g gilt jedoch nur mit gewissen Einschränkungen. In Wirklichkeit muß für jede einzelne Ziege in jeder Periode besonders die unlösliche N-Substanz des Futters bestimmt werden, da 1. die Futterreste auszuschalten sind, und da 2. in den Ersatzperioden sich diese Pepsin-HCl unlösliche N-Substanz um den Betrag der in Trockenhefe und Hafer enthaltenen Mengen verringert. Tatsächlich sind auch diese Differenzen in der Berechnung berücksichtigt worden. Ferner wurde die Division mit 6,25 durchgeführt, um die N-Menge der Stoffwechselprodukte zu erhalten. Diese errechnen sich dann auf (in Grammen):

Bei den Ziegen	1	2	3	4
Im Mittel der Grundperiode . .	— 1,3	— 0,6	0,2	— 1,4
In der I. Ersatzperiode	0,4	—	0,5	—
In der II. „	2,2	1,8	1,3	2,1
In der III. „	0,2	—	0,9	— 0,1
In der IV. „	— 0,9	— 1,8	— 0,4	— 0,3

Nach den *Stutzer*schen Analysen sind im Mittel der Grundperioden keine Stoffwechselprodukte vorhanden; der Grund für diese im Vergleich zu den Resultaten der ersten Berechnungsweise niedriger liegenden Werte kann, wie erwähnt, wohl nur auf der stärkeren Einwirkung der Verdauungssekrete auf die Futter-N-Substanz beruhen, so daß durch Differenz des Futter-N vom Gesamtkot-N in diesem Falle ein richtiges Bild eben nicht zu erzielen wäre. Doch kommt immerhin eine stärkere Ausscheidung von N-Stoffwechselprodukten in der zweiten Ersatzperiode gut zum Ausdruck. Auch die niedrig liegenden Werte für die vierte Ersatzperiode dürften hinlängliche Erklärung finden, denn gerade für schwer verdauliche Substanzen, zu denen auch Ovagsolan zweifellos gehört, ist der Unterschied zwischen den Resultaten des Tierversuchs und der künstlichen Magenverdauung besonders groß; es findet innerhalb des Darmes eine stärkere Aufspaltung statt, als die Pepsin-HCl lösliche N-Substanz des Futters beträgt, und vom Gesamtkot-N entfällt mithin ein beträchtlich größerer Teil auf die N-Stoffwechselprodukte, als die Differenz zwischen ihm und dem unlöslichen Futter-N angibt.

Berechnung von Eiweißgehalt und Stärkewert des Futters auf Grund des Tierversuchs.

Aus den von den Tieren tatsächlich verdauten Nährstoffmengen kann der wirklich verfutterte Stärkewert der einzelnen Perioden bestimmt werden.

Er errechnet sich als Summe[1]):

des verdauten Eiweißes, multipliziert mit dem Faktor 0,94
+ des verdauten Fettes, multipliziert mit dem Faktor 2,02
+ der verdauten Kohlenhydrate, Faktor 1, abzüglich des gesamten verfutterten Zuckers × 0,24,
+ der verdauten Rohfaser, abzüglich der Gesamtheurohfaser nach deren Multiplikation mit dem Faktor 0,58,

und ergibt:

Stärkewert in Grammen.

	Grund-periode I	Ersatz-periode I	Ersatz-periode II	Grund-periode II	Ersatz-periode III	Ersatz-periode IV	Grund-periode III
Ziege 1	754,2	717,1	618,8	728,3	686,6	707,7	701,4
„ 2	728,7	749,3	656,3	723,1	688,2	755,5	716,2
„ 3	750,2	731,8	687,2	670,1	687,7	757,8	734,7
„ 4	743,5	737,7	636,0	771,3	705,8	708,3	743,5

Auf 1000 kg Lebendgewicht bezogen, wurden mithin tatsächlich gefüttert (errechnet aus den oben angeführten Tabellen und dem Durchschnittsgewicht jeder Ziege) an verdaulichem Eiweiß in Kilogrammen:

	Grund-periode I	Ersatz-periode I	Ersatz-periode II	Grund-periode II	Ersatz-periode III	Ersatz-periode IV	Grund-periode III
Ziege 1	4,24	3,28	2,01	3,93	2,05	3,78	3,85
„ 2	4,11	3,63	2,27	4,08	2,33	4,19	4,05
„ 3	4,37	3,71	2,50	4,12	2,34	4,36	4,32
„ 4	4,42	3,67	2,31	4,38	2,53	4,13	4,36

und an Stärkewert in Kilogrammen:

	Grund-periode I	Ersatz-periode I	Ersatz-periode II	Grund-periode II	Ersatz-periode III	Ersatz-periode IV	Grund-periode III
Ziege 1	19,29	18,34	15,82	18,63	17,56	18,10	17,94
„ 2	18,44	18,96	16,60	18,29	17,41	19,11	18,12
„ 3	20,01	19,51	18,33	17,87	18,34	20,21	19,59
„ 4	19,61	19,46	16,78	20,35	18,62	18,69	19,62

Wenn man das Pepsin-Salzsäure unlösliche Protein des Kotes und das Futterreineiweiß zugrunde legt, so ergibt sich aus dem Tierfütterungsversuch ein Eiweißverhältnis von:

	Grund-periode I	Ersatz-periode I	Ersatz-periode II	Grund-periode II	Ersatz-periode III	Ersatz-periode IV	Grund-periode III
Ziege 1	1 : 4,78	1 : 5,80	1 : 9,51	1 : 4,69	1 : 10,00	1 : 5,2	1 : 4,69
„ 2	1 : 4,72	1 : 5,75	1 : 9,30	1 : 4,74	1 : 9,39	1 : 5,2	1 : 4,73
„ 3	1 : 4,79	1 : 5,83	1 : 9,21	1 : 4,75	1 : 9,89	1 : 5,3	1 : 4,80
„ 4	1 : 4,64	1 : 5,84	1 : 9,31	1 : 4,78	1 : 9,00	1 : 5,25	1 : 4,73

[1]) *Kellner*, Die Ernährung der landwirtschaftlichen Nutztiere, S. 625 bis 627. Berlin 1920.

Hieraus geht hervor, daß das Eiweißverhältnis, da es sich um milchgebende Ziegen handelt, in den Grundperioden ein günstiges ist, während es für die Ersatzperioden viel zu weit wird, erweitert es sich doch beinahe um das Doppelte. Gerade diese Berechnungsart, die nur das Reinprotein in Betracht zieht, ist sehr wertvoll; man kann demgegenüber nämlich auch einfach auf das Nährstoffverhältnis Bezug nehmen, berechnet nach dem Pepsin-Salzsäure unlöslichen Kot-N und dem Gesamt-N des Futters:

	Grund-periode I	Ersatz-periode I	Ersatz-periode II	Grund-periode II	Ersatz-periode III	Ersatz-periode IV	Grund-periode III
Ziege 1	1:4,2	1:4,1	1:4,6	1:4,1	1:4,9	1:4,0	1:3,8
„ 2	1:3,9	1:4,2	1:4,7	1:4,0	1:4,8	1:4,1	1:3,9
„ 3	1:4,0	1:4,2	1:4,8	1:4,0	1:5,0	1:4,1	1:4,0
„ 4	1:3,9	1:4,2	1:4,7	1:4,0	1:4,8	1:4,1	1:3,9

oder auf das Nährstoffverhältnis aus dem Gesamt-N des Kotes zu dem des Futters:

	Grund-periode I	Ersatz-periode I	Ersatz-periode II	Grund-periode II	Ersatz-periode III	Ersatz-periode IV	Grund-periode III
Ziege 1	1:4,4	1:4,7	1:5,2	1:4,3	1:5,4	1:4,9	1:4,1
„ 2	1:4,4	1:4,8	1:5,5	1:4,4	1:5,4	1:5,1	1:4,3
„ 3	1:4,6	1:4,9	1:5,6	1:4,6	1:5,6	1:5,4	1:4,5
„ 4	1:4,4	1:4,8	1:5,5	1:4,5	1:5,5	1:5,8	1:4,3

Da das verdauliche Eiweiß durch Amide ersetzt wird und der Stärkewert durch Zuckerzufütterung auf derselben Höhe erhalten bleibt, kann sich das Eiweißverhältnis, nach diesen letzten zwei Methoden bestimmt, naturgemäß gar nicht oder nur wenig ändern; sie zeigen also auch nicht den wichtigen Unterschied in der Zusammensetzung des Proteins.

Das Mittel der verdauten Eiweißmengen der Grundfutterperioden = 161,50 g zu den verdauten Eiweißmengen der Ersatzfutterperioden ergibt auf Grund des Versuchs durch einfache Umrechnung den prozentischen Reineiweißersatz in den Ersatzperioden. Der Eiweißersatz beträgt nach dem Tierversuch nun in Prozenten:

	Ziege				Mittel
	1	2	3	4	
Ersatzperiode I	15,62	11,33	13,24	14,30	13,62
„ II	48,32	44,52	41,38	46,35	45,14
„ III	47,07	43,03	45,25	41,13	44,12
„ IV	2,90	—	—	3,80	1,60

In Ersatzperiode IV findet ein Ersatz des Futtereiweißes durch Amide mithin überhaupt nicht statt. Greift man nämlich zu den *Kellner*schen

Zahlen über die Verdaulichkeit der Futtermittel (in diesem Falle 200 g Kleie, 100 g Leinkuchen und 1000 g Heu), dann würden nach ihnen im ganzen etwa 74 g verdauliches Reineiweiß gefüttert werden; der Tierversuch ergibt für die Hornmehlperiode eine verdauliche Reineiweißmenge von durchschnittlich 159,8 g. Die Differenz von 85,8 g entfällt auf das verdauliche Reineiweiß [1]) des Hornmehls. Das bedeutet eine verdauliche Reineiweiß-N-Menge von 11,8 g, enthalten in 330,94 g Hornmehl. Man kann also nach der Berechnung unter Zugrundelegung der *Kellner*schen Zahlen und des praktisch durchgeführten Tierversuchs wohl annehmen, daß in der vierten Ersatzperiode das verdauliche Reineiweiß in Hafer + Trockenhefe gerade durch dieselbe verdauliche Reineiweißmenge im Hornmehl ersetzt wurde. Diese Periode ergibt also keinen Aufschluß über etwaigen Ersatz von Futtereiweiß durch Amide, hat aber dafür besonderen Wert als Ausnutzungsversuch des Hornmehls im Vergleich zu Trockenhefe + Hafer, ersetzt nach der Menge verdaulicher N-Substanz, und scheint einen vollen Ersatz des Futtereiweißes durch Hornmehl bei einem Ersatz von höchstens 50 Proz. der Gesamtmenge des Futterreineiweißes zu gewährleisten. Die Schlußbetrachtung kommt hierauf noch einmal zurück.

Aufstellung und Vergleich der N-Bilanzen.

Nachdem die aus dem praktischen Tierfütterungsversuch ermittelten Zahlen ergeben haben, daß die Aufgabestellung — nämlich bei gleichbleibender Stärkewert- und gleichbleibender verdaulicher Rohproteinmenge einen Reineiweißersatz von etwa 50 Proz. durch Amide herbeizuführen — erfüllt ist, und nachdem die Abweichungen der Verdauungskoeffizienten ausreichende Erklärung gefunden haben, interessiert nunmehr die weitere Verwertung der aus dem Darm in den Körper übergetretenen N-Substanz. Hierzu dienen die N-Bilanzen, die für den Durchschnitt der einzelnen Perioden je Tag aufgestellt sind.

N in Grammen angegeben.

	Grundperiode I	Ersatzperiode I	Ersatzperiode II	Grundperiode II	Ersatzperiode III	Ersatzperiode IV	Grundperiode III
				Ziege 1.			
Im Futter . .	38,8	35,0	32,3	35,7	32,5	41,8	36,0
Im Kote . . .	10,2	9,5	9,9	8,2	8,2	16,7	9,0
Verdaut . . .	28,5	25,5	22,4	27,5	24,3	25,1	27,0
Im Harn . . .	16,6	16,8	13,5	18,6	17,3	16,2	19,7
In der Milch .	7,5	7,4	7,4	5,9	4,1	5,4	3,9
Differenz als Fleisch? . .	+ 4,5	+ 1,3	+ 1,5	+ 2,9	+ 2,9	+ 3,5	+ 3,4
				Ziege 2.			
Im Futter . .	39,3	38,0	35,8	38,9	35,2	45,1	38,9
Im Kote . . .	11,3	10,8	11,6	11,3	9,8	17,9	10,9
Verdaut . . .	28,0	27,1	24,2	27,6	25,4	27,2	28,0
Im Harn . . .	17,2	17,0	13,6	17,2	15,4	15,5	19,2
In der Milch .	9,0	7,8	7,6	6,2	5,3	8,6	5,8
Differenz als Fleisch? . .	+ 1,7	+ 2,3	+ 3,0	+ 4,2	+ 4,7	+ 3,1	+ 3,0

[1]) Natürlich nicht wirkliches Eiweiß, sondern Hornsubstanz, etwa leimgebende Masse.

	Grundperiode I	Ersatzperiode I	Ersatzperiode II	Grundperiode II	Ersatzperiode III	Ersatzperiode IV	Grundperiode III
			Ziege 3.				
Im Futter . .	39,3	38,0	35,5	38,9	35,2	44,5	38,9
Im Kote . . .	11,7	11,4	10,9	13,3	10,8	18,9	11,7
Verdaut . . .	27,6	26,6	24,6	25,7	24,4	25,6	27,2
Im Harn . . .	16,5	16,6	13,6	16,6	14,8	14,1	18,6
In der Milch .	7,6	7,7	7,2	6,4	5,5	7,6	6,2
Differenz als Fleisch? . .	+ 3,5	+ 2,3	+ 3,8	+ 2,7	+ 4,1	+ 3,9	+ 2,4
			Ziege 4.				
Im Futter . .	39,3	38,0	35,5	38,9	35,4	44,0	38,9
Im Kote . . .	11,0	10,8	11,7	10,3	9,7	18,7	10,1
Verdaut . . .	28,3	27,2	23,8	28,7	25,6	25,3	28,8
Im Harn . . .	18,3	18,9	14,6	18,7	15,2	15,1	18,5
In der Milch .	6,7	6,3	7,9	5,1	5,2	8,6	5,7
Differenz als Fleisch? . .	+ 3,3	+ 2,0	+ 1,3	+ 4,9	+ 5,2	+ 1,6	+ 4,6

Auffallend erscheinen zunächst im Vergleich mit den Veröffentlichungen entsprechender, vorher erwähnter Arbeiten die niedrigen N-Ausscheidungen im Harn während der Ersatzperioden, vor allem der starken Ammoniumacetatperiode. Berücksichtigt man jedoch, daß in diesem Versuch im sonstigen Futter auch erheblich geringere N-Mengen den Tieren zugeführt und von ihnen verdaut wurden, so findet man, wie nachstehend noch näher berechnet sein wird, daß in den Ersatzperioden mit Ammoniumacetat und Harnstoff in Wirklichkeit vielfach sogar ein geringes Plus an N im Harn ausgeschieden wird, und zwar in Grammen:

Bei Ziege	1	2	3	4
In der Ammoniumacetatperiode .	1,2	0,1	— 0,8	0,9
In der Harnstoffperiode	1,5	— 0,3	— 0,4	— 0,4

Somit tritt bei Ammoniumacetatfütterung nur bei Ziege 3, bei Harnstoff dagegen bei den Ziegen 2, 3 und 4 eine dabei auch nur äußerse geringe Retention auf, während die übrigen Ziegen eine geringfügigt vermehrte N-Ausscheidung aufweisen. Die Möglichkeit einer schwachen Retention läßt sich nun wenigstens für Ammoniumacetat wohl kaum von der Hand weisen; so fanden z. B. *Grafe* und *Schläpfer*[1]) bei Verfütterung von an organische Säuren, wie Essig- und Zitronensäure gebundenem Ammoniak bei Hunden und Schweinen regelmäßig eine „zum Teil recht erhebliche“ N-Retention. Ob aber die Ursache in

[1]) *Grafe* und *Schläpfer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **77**, 1, 1912.

einem Aufbau von Eiweiß aus Ammoniak und Kohlenhydraten durch die Leber zu suchen sei, erscheine ungewiß.

Die Höhe der Enddifferenzen und ihre Schwankungen bei den einzelnen Ziegen in den verschiedenen Perioden erklären sich zum Teil durch bei Kastenversuchen nur schwer vermeidliche Verluste, zum Teil durch den Umstand, daß für das Zustandekommen des N-Gleichgewichts die Länge der Perioden nicht besonders lang bemessen war, zum Teil durch Fleischansatz; denn den Gewichtstabellen ist zu entnehmen, daß das Gewicht der Ziegen während der Versuchsdauer sich langsam aufwärts bewegt. Infolge sinkender Lactation werden immer weniger Eiweiß und Stärkewerte für die Milchproduktion nötig und werden statt dessen zur Fleisch-, Fett- und Wärmebildung herangezogen, und zwar ist aus der erhöhten N-Ausscheidung im Harn gegen Ende des Versuchs hin — die Unterschiede zwischen der ersten und dritten Grundperiode betragen je Tag bis zu über 2 g — darauf zu schließen, was ja auch schon aus zahlreichen Tierversuchen hinlänglich bekannt ist, daß bei ausgewachsenen Tieren, — und um solche handelt es sich auch hier, — ein verstärkter Fleischansatz kaum stattfindet, vielmehr das zu Ende des Versuchs im Futter im Überfluß vorhandene Eiweiß größtenteils zur Fettbildung herangezogen wird, also einer Spaltung in eine Kohlenhydratgruppe und Harnstoff unterliegt, welch letzterer ungenützt durch die Nieren den Körper verläßt. Die Ersatzfutterperioden haben durchweg besonders günstig auf die Lebendgewichtszunahme eingewirkt, so daß die Ziegen das in ihnen erreichte Gewicht in den anschließenden Grundperioden nicht zu halten vermögen. Doch kann aus der Gewichtszunahme auf Fleischansatz nur in Verbindung mit positiven N-Bilanzen geschlossen werden; weil aber diese beiden Bedingungen vorliegen, erscheint jedenfalls die Möglichkeit einer Verwendung von Amiden zum Fleischansatz gegeben. Ferner erlauben Verdauungskoeffizienten und N-Bilanzen einen Schluß auf die Verwertung des Ammoniumacetat-N und Harnstoff-N im Vergleich zum Eiweiß-N, denn die Differenz zwischen resorbierter und im Harn ausgeschiedener N-Menge in den Grundfutterperioden ergibt die Verwertung des Eiweiß-N. Ersetzen wir nun einen Teil von diesem durch Ammoniumacetat- oder Harnstoff-N, so wird die Wirkung dieser beiden N-Substanzen im Vergleich zum Eiweiß der ersetzten Futtermittel mithin in ihrer Wirkung um die N-Mengen erniedrigt oder erhöht, die mehr bzw. weniger im Harn ausgeschieden werden, also ungenutzt den Körper verlassen; daraus läßt sich die prozentische Ausnutzung des Ammoniumacetat- und Harnstoff-N im Vergleich zum Eiweiß-N ermitteln.

Zu diesem Zwecke bezieht man die Harn-N-Ausscheidungen der ersten und zweiten Ersatzperiode auf die Mittelwerte der Harn-N-Mengen der sie

einschließenden ersten und zweiten Grundperiode und die der dritten und vierten Ersatzperiode auf die der zweiten und dritten Grundperiode. Es wird nach dieser Rechnung an Harn-N mehr (+) oder weniger (—) in den Ersatzperioden ausgeschieden als in den auf sie bezogenen Grundperioden in Grammen je Tag:

Bei den Ziegen	1	2	3	4
In der I. Ersatzperiode	—0,8	—0,2	—	+ 0,4
In der II. „	—4,1	—3,6	—3,0	—3,9
In der III. „	—1,9	—2,8	—2,8	—3,4
In der IV. „	—3,0	—2,7	—3,4	—3,5

Infolge des geringeren N-Gehalts des Futters der Ersatzperioden und geringerer Ausscheidung im Kote (siehe Tabellen über Ausnutzungsversuche) sind weniger Gramm N verdaut worden, als es dem Durchschnitt der Grundfutterperioden entspricht:

Bei den Ziegen	1	2	3	4
In der I. Ersatzperiode	2,1	0,7	0,2	1,4
In der II. „	5,3	3,7	2,2	4,8
In der III. „	3,4	2,5	2,4	3,0
In der IV. „	2,6	0,7	1,2	3,3

Für den Vergleich der Verwertung von Eiweiß- und Ersatz-N müssen diese weniger verdauten N-Mengen den Differenzen der Harn-N-Ausscheidungen zwischen Grund- und Ersatzfutterperioden noch zugezählt werden. Mithin werden bei einem Ersatz von 5 g Eiweiß durch 5 g Ammoniumacetat-N (I. Ersatzperiode.) weniger (—) Gramm N ausgenutzt im Vergleich zum Eiweiß-N bei den Ziegen:

1	2	3	4
—1,3	—0,5	—0,2	—1,8

und bei einem Ersatz von 11,98 g Eiweiß-N durch 11,98 g Ammoniumacetat- oder Harnstoff-N weniger (—) oder mehr (+) im Vergleich zum Eiweiß-N:

Bei den Ziegen	1	2	3	4
Starke Ammonperiode	—1,2	—0,1	+ 0,8	—0,9
Harnstoffperiode	—1,5	+ 0,3	+ 0,4	+ 0,4
Die betreffenden Zahlen liegen				
für die Hornmehlperiode bei . .	+ 0,4	+ 2,0	+ 2,3	+ 0,2

Das ergibt eine Ausnutzung des Ammoniumacetat-N im Vergleich zum Eiweiß-N in der schwachen Ammoniumacetatperiode bei den Ziegen:

	1	2	3	4
von (in Proz.)	74,0	90,2	94,4	62,2
in der starken (II.) Ersatzperiode:				
von (in Proz.)	90,0	99,0	105,6	92,5
des Harnstoff-N im Vergleich zum Eiweiß-N in der dritten Periode:				
von (in Proz.)	87,8	102,9	103,6	103,8
und des Hornmehl-N (Ovagsolan) zum Eiweiß-N in der vierten Periode:				
in Proz. von	103,3	116,9	119,4	102,1

Diese außerordentlich starke Hinzuziehung der N-Salze für den Eiweißersatz scheint bestätigt zu werden durch die Höhe der N-Ausscheidungen in der Milch und durch die positive N-Bilanz, die für einen Fleischansatz spricht.

Im Anschluß hieran seien die Tabellen über die Verwertung der N-Substanz zur Milchbildung angeführt, die damit den zweiten Teil der Ausführung, die Wirkung der Eiweißersatzfuttermittel auf die Milchproduktion, einleiten sollen.

Einfluß der N-Salze auf die Milchproduktion.

1. Berechnet aus Reinprotein-N des Futters und Pepsinsalzsäure unlöslichem N des Kotes.

	Grundperiode I	Ersatzperiode I	Ersatzperiode II	Grundperiode II	Ersatzperiode III	Ersatzperiode IV	Grundperiode III
			Ziege 1.				
Verdaut . . .	26,4	20,5	12,5	24,5	12,8	23,6	24,0
Erhaltungs-N	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Differenz der N-Bilanz . .	4,5	4,3	1,5	2,9	2,9	3,5	3,4
Für Milchproduktion . .	19,4	13,7	8,5	19,1	7,4	17,6	18,1
In der Milch .	7,5	7,4	7,4	5,9	4,1	5,5	3,9
In der Milch in Proz. des für sie verfügbaren N	38,8	54,3	87,1	31,0	55,5	31,0	21,3
			Ziege 2.				
Verdaut . . .	26,0	22,9	14,3	25,8	14,7	26,5	25,8
Erhaltungs-N	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Differenz der N-Bilanz . .	1,7	2,3	3,0	4,2	4,7	3,1	3,1
Für Milchproduktion . .	21,8	18,1	8,8	19,1	7,5	20,9	20,2
In der Milch .	9,0	7,8	7,6	6,2	5,3	8,6	5,8
In der Milch in Proz. des für sie verfügbaren N	41,4	43,3	85,5	32,7	71,3	41,3	28,7

	Grundperiode I	Ersatzperiode I	Ersatzperiode II	Grundperiode II	Ersatzperiode III	Ersatzperiode IV	Grundperiode III
			Ziege 3.				
Verdaut . . .	26,3	22,2	15,0	24,7	14,0	26,1	25,9
Erhaltungs-N	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
Differenz der N-Bilanz . .	3,5	2,4	3,8	2,7	4,1	3,9	2,4
Für Milchproduktion . .	20,4	17,4	8,8	19,7	7,5	19,8	21,1
In der Milch .	7,6	7,7	7,2	6,4	5,5	7,6	6,2
In der Milch in Proz. des für sie verfügbaren N	37,3	44,0	81,6	32,7	73,6	38,4	29,3
			Ziege 4.				
Verdaut . . .	26,8	22,3	14,0	26,4	15,3	25,1	26,5
Erhaltungs-N	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
Differenz der N-Bilanz . .	3,3	1,9	1,3	4,9	5,2	1,6	4,6
Für Milchproduktion . .	21,1	18,0	10,3	19,1	7,7	21,1	19,5
In der Milch .	6,7	6,3	7,9	5,1	5,2	8,6	5,7
In der Milch in Proz. des für sie verfügbaren N	31,6	35,2	77,0	26,7	67,9	41,1	29,3

Der Berechnung des Erhaltungs-N wurde das Durchschnittsgewicht der einzelnen Ziege während der Versuchsdauer zugrunde gelegt, es beträgt

für Ziege 1 . . . . 39,1 kg
„ „ 2 . . . . 39,53 „
„ „ 3 . . . . 37,5 „
„ „ 4 . . . . 37,9 „

Als Erhaltungseiweiß wurde mit *Morgen*, Die Landwirtschaftlichen Versuchsstationen **66**, 1907 und **68**, 1908: 400 g Eiweiß = 64 g Eiweiß-N auf 1000 kg Lebendgewicht angenommen.

Den Einfluß von Ammoniumacetat und Harnstoff sowie des Hornmehls als Ersatz von verdaulichem Reineiweiß auf die Milchproduktion zeigt der Vergleich der Menge, des Fett- und des Trockensubstanzgehaltes der Milch in den Grund- und Ersatzfutterperioden.

Zu berücksichtigen ist der Abfall der Milchproduktion mit Fortschreiten der Lactation. Den bei einfachem Gegenüberstellen somit entstehenden Fehler vermeidet am vollkommensten das *Morgen*sche[1]) Verfahren, das „aus der Anfangs- und Schlußperiode mit gleichem Futter die tägliche Depression berechnet, diese mit der Zahl der Tage multipliziert, die zwischen der Mitte der Anfangs- und der Mitte der zu vergleichenden Periode liegen, das Produkt von dem Ertrag der Anfangsperiode abzieht und diese Zahl mit dem gefundenen Ertrag der Zwischenperiode vergleicht".

[1]) *Morgen*, Die landwirtschaftl. Versuchsstationen **77**, 351, 1912.

Die Spanne zwischen der Mitte von Grundperiode I und
Ersatzperiode I umfaßt . . . . 20 Tage
zwischen Grundperiode I und Ersatzperiode II . . . . 40 „
„ „ I „ Grundperiode II . . . . 61 „
„ „ II „ Ersatzperiode III . . . 21 „
„ „ II „ „ IV . . . . 39,5 „
„ „ II „ Grundperiode III . . . 56 „
„ „ I „ „ III . . . 117 „

In allen Fällen gilt als Mitte die der eigentlichen Vergleichsperioden, die in der Regel 13 Tage umfassen, da von jeder Periode die ersten 7 Tage als Vorfütterungsabschnitt für die Beurteilung ausscheiden.

Die tägliche Depression beträgt in Grammen (Milchmenge) für die Ziegen:

	1	2	3	4	5
Von der I. bis II. Grundperiode . .	7,95	10,54	3,24	4,28	6,92
„ „ II. „ III. „ . .	11,20	8,32	9,93	3,52	0,00

Hinsichtlich der Fettmenge beträgt die Depression für die Ziegen:

	1	2	3	4	5
Von der I. bis II. Grundperiode . .	—0,01	0,112	0,047	—0,004	—0,036
„ „ II. „ III. „ . .	0,294	0,101	0,120	—0,057	0,005

Die Trockensubstanz der Milch erfährt folgenden Abfall, wieder in Grammen angegeben, je Tag für die Ziegen:

	1	2	3	4	5
Von der I. bis II. Grundperiode . .	0,9	1,26	0,59	0,53	0,80
„ „ II. „ III. „ . .	1,0	0,44	0,65	—0,1	—0,25

Das Produkt aus der täglichen Depression und der Anzahl der Tage zwischen den Mitten der einzelnen Perioden ist der Differenzwert, um den die betreffenden Anfangsperioden verringert werden müssen, damit sie rechnerisch auf dasselbe Lactationsstadium der zu beurteilenden Ersatzperioden gebracht und so fehlerfrei mit ihnen verglichen werden können. Diese Differenzwerte sind hier festgestellt:

Ziege:	1 g	2 g	3 g	4 g	5 g
1. Milchmenge.					
Differenzwert für Grundperiode I zur Umrechnung auf das Lactationsstadium der Ersatzperiode I	159	211	65	86	138
Für Grundperiode I auf Ersatzperiode II	318	421	130	171	277
„ „ I „ Grundperiode II	485	643	198	261	422
„ „ II „ Ersatzperiode III	235	175	208	74	—
„ „ II „ „ IV	442	329	392	139	—
„ „ II „ Grundperiode III	627	466	556	197	—5

Ziege:	1	2	3	4	5
	g	g	g	g	g
2. Fettmenge.					
Für Grundperiode I auf Ersatzperiode I	—0,20	2,24	0,94	—0,08	0,72
„ „ I „ „ II	—0,40	4,48	1,88	—0,16	1,44
„ „ I „ Grundperiode II	—0,61	6,83	2,87	—0,24	2,20
„ „ II „ Ersatzperiode III	6,17	2,12	2,52	—1,19	—0,10
„ „ II „ „ IV	11,63	4,00	4,74	—2,25	—0,20
„ „ II „ Grundperiode III	16,46	5,66	6,72	—3,19	—0,28
3. Trockensubstanzmenge.					
Für Grundperiode I auf Ersatzperiode I	17,9	25,26	11,8	10,5	16,0
„ „ I „ „ II	35,9	50,5	23,7	21,0	32,1
„ „ I „ Grundperiode II	54,7	77,0	36,2	32,1	48,9
„ „ II „ Ersatzperiode III	20,5	9,2	13,7	—1,9	—5,3
„ „ II „ „ IV	38,6	17,2	25,8	—3,6	—9,95
„ „ II „ Grundperiode III	54,8	24,4	36,6	—5,1	—14,1

Die Differenzen dieser Zahlen von den Werten der Grundfutterperioden nennt man nach *Morgen*[1]) die „korrigierten Werte", die nun mit den tatsächlich erhaltenen Werten verglichen, ein richtiges Urteil ermöglichen.

1. Milchmenge.

I. Ersatzperiode, 12 Proz. Ammoniumacetat.

Ziege:	1	2	3	4	5
Korrigierter Wert	1637	1934	1748	1535	1409
Wirkliche Menge	1613	1819	1831	1542	1530
Differenz	—24	—115	+83	+7	+121
Wert der Ersatzperiode in Proz. der Grundperiode	98,5	94,0	104,8	100,5	108,6

II. Ersatzperiode, 45 Proz. Ammoniumacetat.

Ziege:	1	2	3	4	5
Korrigierter Wert	1478	1724	1683	1450	1270
Wirkliche Menge	1833	1845	1911	1792	—
Differenz	+355	+121	+228	+342	—
Wert der Ersatzperiode in Proz. der Grundperiode	124	107	113,5	123,6	—

III. Ersatzperiode, 45 Proz. Harnstoff.

Ziege:	1	2	3	4	5
Korrigierter Wert	1076	1327	1407	1286	1125
Wirkliche Menge	904	1378	1403	1371	1221
Differenz	—172	+51	—4	+85	+96
Wert der Ersatzperiode in Proz. der Grundperiode	84,0	103,8	99,7	106,6	108,5

[1]) *Morgen*, a. a. O.

IV. Ersatzperiode, 45 Proz. Hornmehl.

Ziege:	1	2	3	4	5
Korrigierter Wert	869	1173	1223	1221	1125
Wirkliche Menge	940	1525	1491	1606	1348
Differenz	+ 71	+ 352	+ 268	+ 385	+ 223
Wert der Ersatzperiode in Proz. der Grundperiode	108,2	130	122	131,6	119,8

2. Fettmenge.

I. Ersatzperiode.

Ziege:	1	2	3	4	5
Korrigierter Wert	43,34	58,36	45,78	42,73	44,00
Wirkliche Menge	50,62	58,44	50,79	46,93	50,50
Differenz	+ 7,28	+ 0,08	+ 5,01	+ 4,20	+ 6,50
Wert der Ersatzperiode in Proz. der Grundperiode	117	100,1	111	109,8	114,8

II. Ersatzperiode.

Ziege:	1	2	3	4	5
Korrigierter Wert	43,54	56,12	44,84	42,81	43,28
Wirkliche Menge	56,09	61,68	56,57	51,52	—
Differenz	+ 12,55	+ 5,56	+11,73	+ 8,71	—
Wert der Ersatzperiode in Proz. der Grundperiode	128,8	109,9	126,2	120,4	—

III. Ersatzperiode.

Ziege:	1	2	3	4	5
Korrigierter Wert	37,59	51,65	41,31	44,07	42,63
Wirkliche Menge	28,08	44,10	33,87	34,36	34,31
Differenz	— 9,51	— 7,55	— 7,44	— 9,71	— 8,32
Wert der Ersatzperiode in Proz. der Grundperiode	74,7	85,38	81,99	77,97	80,48

IV. Ersatzperiode.

Ziege:	1	2	3	4	5
Korrigierter Wert	32,13	49,77	39,09	45,13	42,73
Wirkliche Menge	25,69	45,33	35,49	42,66	31,71
Differenz	— 6,44	— 4,44	— 3,60	— 2,47	— 11,02
Wert der Ersatzperiode in Proz. der Grundperiode	79,96	91,08	90,79	94,53	74,21

3. Trockensubstanz.

I. Ersatzperiode.

Ziege:	1	2	3	4	5
Korrigierter Wert	176,1	215,9	183,9	160,3	157,7
Wirkliche Menge	183,5	209,5	196,6	173,1	172,2
Differenz	+ 7,4	— 6,6	+ 12,7	+ 12,8	+ 14,4
Wert der Ersatzperiode in Proz. der Grundperiode . .	104,2	97	107	108	109

II. Ersatzperiode.

Ziege:	1	2	3	4	5
Korrigierter Wert	158,2	190,7	172,1	149,7	141,6
Wirkliche Menge	202,8	212,6	205,0	194,3	—
Differenz	+ 44,6	+ 21,9	+ 33,0	+ 44,6	—
Wert der Ersatzperiode in Proz. der Grundperiode . .	128,2	111,5	119,2	129,8	—

III. Ersatzperiode.

Ziege:	1	2	3	4	5
Korrigierter Wert	118,8	155,0	145,8	140,6	130,1
Wirkliche Menge	105,7	157,5	143,1	146,2	138,3
Differenz	— 13,1	+ 2,5	— 2,7	+ 5,6	+ 8,2
Wert der Ersatzperiode in Proz. der Grundperiode . .	89	101,6	98,1	104	106,3

IV. Ersatzperiode.

Ziege:	1	2	3	4	5
Korrigierter Wert	100,7	146,9	133,7	142,3	134,8
Wirkliche Menge	105,8	174,2	152,2	174,9	145,4
Differenz	+ 5,1	+ 27,3	+ 18,5	+ 32,6	+ 10,6
Wert der Ersatzperiode in Proz. der Grundperiode . .	105	118,6	113,8	122,9	107,9

Nach den Resultaten übt ein 50proz. Ersatz des verdaulichen Reineiweißes durch die entsprechende Menge Ammoniumacetat auf die Milchproduktion einen ausschließlich günstigen Einfluß aus, der sich in einer wesentlichen Steigerung der absoluten Menge, des absoluten Fett- und absoluten Trockensubstanzgehaltes der Milch äußert. Denn die Werte dieser Ersatzperiode übersteigen nicht nur die korrigierten, also auf dasselbe Lactationsstadium reduzierten, sondern sogar die tatsächlichen Ergebnisse der 5 Wochen vorhergelegenen Grundfutterperiode, so daß damit eine günstige Beeinflussung außer

Frage gestellt zu sein scheint. Die prozentische Zusammensetzung der Milch bleibt ziemlich unberührt. Demgegenüber stellt *Morgen* in seinen Versuchen betreffs Eiweißersatz durch Ammoniumacetat[1]) die unbedingte Überlegenheit des Eiweißfutters über die N-Salze fest und weist eine etwaige Erklärung der niedrigeren Erträge der Ersatzfutterperioden durch den geringeren Stärkewert derselben — denn der Eiweißersatz durch Ammoniumacetat fand ohne Zugaben von Kohlenhydraten statt — mit eingehenderer Begründung zurück. Es kann jedoch aus dem hier vorliegenden Zahlenmaterial eine andere Schlußfolgerung als die soeben von mir gebrachte nicht gezogen werden. Ein weniger günstiges Bild zeigt der Ersatz durch Harnstoff. Die Ziegen 1 und 3 reagieren in ungünstigem, die Ziegen 2, 4 und 5 in günstigem Sinne hinsichtlich der Menge und des Trockensubstanzgehaltes der Milch; der prozentische und absolute Fettgehalt der Milch verringert sich ausnahmslos. Dies erscheint um so auffallender, als gerade das Ammoniumacetat Verdauungsstörungen und -depression gegenüber dem Harnstoff verursachte. Doch deckt sich das Resultat andererseits mit Versuchen am männlichen Wiederkäuer von *Kellner*, bei denen das essigsaure Ammoniak und das Asparagin die anderen Amide in betreff des Eiweißersatzes übertrafen. Hornmehl vermehrte durchweg bedeutend Milchmenge und -trockensubstanz, drückte den absoluten Fettgehalt leicht, den prozentischen, wie die Tabellen zeigen, mithin äußerst stark, wodurch die Qualität der Milch sich sehr verschlechterte.

Um die Erfolge der Ersatzperioden untereinander in fehlerfreie Beziehung bringen zu können, sind sie nach dem *Morgen*schen Verfahren[2]) auf die höchstmöglichen Milcherträge umgerechnet durch einfache Proportion. Hierdurch tritt die besonders gute Wirkung des Ammoniumacetats scharf hervor. Werden nämlich nach Durchführung dieser Methode die Erträge der 50proz. Ammoniumacetat-Ersatzperiode = 100 gesetzt, dann belaufen sich die der anderen Ersatzperioden auf:

Ziege:	1	2	3	4
1. Milchmenge.				
Schwache Ammoniumacetatperiode	79,5	87,9	92,2	81,8
Harnstoffperiode	67,8	97,0	87,8	86,3
Hornmehlperiode	87,2	121,5	107,3	106,5
2. Fettmenge.				
Schwache Ammoniumacetatperiode	90,7	91,1	87,9	91,2
Harnstoffperiode	58,0	77,7	65,0	64,8
Hornmehlperiode	62,1	82,9	72,0	78,5

[1]) *Morgen*, Die landwirtschaftl. Versuchsstationen **73**, 285, 1910; **75**, 265, 1911.

[2]) *Derselbe*, Ebendaselbst **77**, 351, 1912.

3. Trockensubstanzmenge.

Ziege:	1	2	3	4
Schwache Ammoniumacetatperiode	81,2	87,0	89,7	83,2
Harnstoffperiode	69,4	91,1	82,3	80,1
Hornmehlperiode	81,9	95,3	95,5	94,7

Zur besseren Übersicht seien hier noch die Ergebnisse der Ersatzperioden, bezogen auf die Grundfutterperioden, zusammengestellt.

Grundfutterertrag = 100, dann

Ziege:	1	2	3	4	5
1. Für Milchmenge.					
Ammoniumacetatperiode, schwach . .	98,5	94,0	104,8	100,5	108,6
Ammoniumacetatperiode, 50 Proz. . . .	124,0	107,0	113,5	123,6	—
Harnstoffperiode	84,0	103,8	99,7	106.6	108,5
Hornmehlperiode	108,2	130,0	122,0	131,6	119,8
2. Für Fettmenge.					
Ammoniumacetatperiode, schwach . .	117,0	100,1	111,0	109,8	114,8
Ammoniumacetatperiode, 50 Proz. . . .	128,8	109,9	126,2	120,4	—
Harnstoffperiode	74,7	85,4	82,0	78,0	80,5
Hornmehlperiode	80,0	91,1	90,8	94,5	74,2
3. Für Trockensubstanz.					
Ammoniumacetatperiode, schwach . . .	104,2	97,0	107,0	108,0	109,1
Ammoniumacetatperiode, 50 Proz. . . .	128,2	111,5	119,2	129,8	—
Hornmehlperiode	105,0	118,6	113,8	122,9	107,9
Harnstoffperiode	89,0	101,6	98,1	104,0	106,3

Zusammenfassung.

Zusammengefaßt erlauben der erste und zweite Teil dieser Arbeit folgende Schlüsse:

Die Verwertung des Harnstoffs beträgt durchschnittlich 96,6 Proz., des Ammoniumacetats 98,6 Proz. und des Hornmehl-N 113,1 Proz. der Verwertung des Eiweiß-N. Diese Zahlen liegen, verglichen mit denen anderer Arbeiten, zwar sehr hoch, doch lassen die Vergleiche des Durchschnittsgewichts und der durchschnittlichen Milchproduktion der einzelnen Perioden sie trotzdem wohl glaubhaft erscheinen. Die Ziegen erzeugen nämlich durchschnittlich in Prozenten der Grundfutterperioden an:

	Milchgesamtmenge	Milchfettmenge	Milchtrockensubstanzmenge
In der Ammoniumacetatperiode .	117	121	122,2
„ „ Harnstoffperiode	100,5	80	99,8
„ „ Hornmehlperiode	122	86	113,6

Bei etwa 50proz. Ersatz des Futtereiweißes eines reichlichen Produktionsfutters durch Ammoniumacetat werden Gesamtmilch-, Milchfett- und Milchtrockensubstanzmenge erheblich erhöht, ohne daß eine Veränderung in der prozentischen Milchzusammensetzung einträte. Hornmehl drückt dagegen bei gleichzeitiger Steigerung der Gesamtmilch- und Milchtrockensubstanzmenge den Fettgehalt erheblich und verschlechtert daher die Qualität der Milch wesentlich. Auch Harnstoff wirkt in diesem Versuch nachteilig auf den Fettgehalt, übt aber keinen Einfluß auf die Milchmenge und den Trockensubstanzgehalt aus.

Das Körpergewicht wird in günstigem Sinne beeinflußt.

Eine im Durchschnitt vorhandene 97proz. Verwertung des Harnstoffs gegenüber dem Eiweiß-N, eine erhöhte positive N-Bilanz, Erhöhung des Körpergewichts und gleichbleibende Milchtrockensubstanzmenge machen einen Fleischansatz in der Harnstoffperiode sehr wahrscheinlich[1]) und lassen darauf schließen, daß Harnstoff als Eiweißersatz in den genannten Mengen sehr wohl zu dienen vermag, und daß er im Tierkörper auch dieselben Wirkungen hervorruft. Eine Reizwirkung auf die Milchdrüse braucht hierbei kaum in Frage zu kommen[2]). Dagegen scheint Ammoniumacetat auf die Milchdrüse noch eine besondere Reizwirkung auszuüben, die sich äußerlich in der Ausscheidung einer erhöhten Milchmenge gleicher Qualität und in niedrigerer positiver N-Bilanz erkennen und dahin erklären läßt, daß die vermehrte Milchproduktion auf Kosten des Fleischansatzes vor sich geht; die sehr erhebliche Gewichtszunahme ist hier sicherlich mehr auf Fettansatz zurückzuführen als in Grund- und Harnstoffperioden. Die höhere Verwertung des Hornmehls kann, wie bereits ausgeführt, als Folge des Ersatzes der verdaulichen Eiweißmenge von Trockenhefe und Hafer durch dieselbe Menge verdaulichen Eiweißes bzw. Hornsubstanz im Hornmehl erklärt werden; und in diesem Falle beteiligen sich dann wohl die Amide ebenfalls an Milch- oder Fleischbildung, könnten mithin als eiweißersetzend angesehen werden. Auch hier kann eine Reizwirkung wie beim Ammoniumacetat sehr wohl vorliegen, erscheint vielleicht um so wahrscheinlicher, als z. B. Hornmehl (hier Ovagsolan) die Wollproduktion bei Schafen erheblich steigern soll.

Die Arbeit gestattet mithin den Schluß auf nahezu volle Ersatzmöglichkeit des Futtereiweißes durch Ammoniumacetat bei einem Ersatz bis zu 50 Proz., das in der Milchbildung jenem sogar noch über-

---

[1]) *Völtz*, Landwirtschaftl. Jahrbücher **59**, 339, 1924.

[2]) Demgegenüber *Morgen*, Die landwirtschaftl. Versuchsstationen **103**, 1, 1924.

legen erscheint, auf etwas geringere des Harnstoffs, namentlich hinsichtlich des niedrigeren Fettgehaltes, auf volle Verwertung der verdaulichen Hornmehl-N-Substanz hinsichtlich der Milchmenge, während die Qualität der Milch sehr erheblich darunter leidet.

Es liegt allerdings vielleicht die Gefahr vor, daß N in den Ersatzperioden bei gleichzeitiger vermehrter Wasseraufnahme im Körper zurückgehalten[1]) und beides dann in den Grundperioden wieder abgegeben wird, Körpereiweiß dagegen zu der Milchproduktion verwendet und in den Grundperioden wieder erzeugt wird. Doch wird man wohl hier diese etwaige Vermutung fallen lassen können, da in unserem Falle zwei aufeinander folgende Ersatzperioden 6 Wochen umfassen, eine erhöhte N-Ausscheidung innerhalb dieser Zeit also unbedingt hätte eintreten müssen, wenn sie in Frage gekommen wäre, und da eine vermehrte Wasseraufnahme oder eine verminderte Wasserabgabe im Harn nicht stattfand.

Fettprozente und Fettmenge der Milch.

Vom 18. Mai bis 7. Juni 1923. Grundfutterperiode I.

Fettprozente					Fettmenge in g				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
2,5	3,6	2,7	2,7	2,9	48,6	64,4	49,7	46,3	47,0
2,4	3,2	2,7	2,7	2,8	45,3	66,5	52,3	45,8	41,9
2,0	3,5	2,6	2,9	2,9	36,4	69,6	45,9	50,3	43,0
2,0	3,0	2,7	3,0	3,2	38,4	60,5	50,7	54,5	46,7
2,2	4,0	2,7	2,8	3,2	38,9	86,3	51,2	49,0	47,7
2,7	3,9	2,7	2,7	2,8	50,3	93,4	49,6	47,5	40,4
3,0	3,3	2,7	2,7	3,0	57,9	74,6	49,5	46,4	43,7
1,9	2,5	2,4	2,7	3,0	34,7	57,4	47,2	47,5	45,2
2,0	2,7	2,6	2,7	2,8	39,5	61,4	47,5	46,0	43,2
1,9	2,7	2,7	2,7	3,0	32,5	62,0	51,7	45,6	44,2
2,9	3,1	2,7	2,7	3,0	52,7	69,9	48,9	44,9	45,8
2,7	3,1	2,9	2,7	3,1	53,7	68,8	52,5	46,5	51,7
3,0	3,1	2,6	2,6	3,9	52,8	69,6	50,6	43,3	44,1
2,7	3,1	2,9	2,6	3,0	44,6	65,8	50,3	42,3	45,6
2,4	2,6	2,5	2,5	3,0	40,3	55,6	42,3	38,8	41,5
2,2	2,4	2,3	2,5	2,4	42,6	51,4	40,9	41,3	39,9
2,4	2,6	2,4	2,6	2,6	43,1	53,6	42,1	42,1	39,4
2,4	3,0	2,6	2,6	3,0	40,0	59,1	44,8	38,1	46,6
2,3	2,9	2,6	2,7	2,7	39,2	55,0	46,9	40,2	40,2
2,5	3,0	2,4	2,6	3,0	44,9	58,0	41,5	37,9	45,8
Mittel:									
2,4	2,83	2,58	2,63	2,89	43,14	60,60	46,72	42,65	44,72

[1]) *Scheunert*, diese Zeitschr. **133**, 137, 1922.

Vom 8. bis 27. Juni 1923. Ersatzperiode I.

Fettprozente					Fettmenge in g				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
2,1	2,4	2,7	2,5	2,9	38,1	44,5	46,6	36,7	42,2
2,9	3,0	2,7	2,6	3,1	52,0	61,0	47,9	39,6	46,7
2,7	2,0	3,2	2,8	2,8	48,2	39,2	57,7	42,2	41,4
2,8	2,8	2,7	2,9	3,4	45,8	54,7	47,1	44,1	51,7
2,8	3,4	2,9	2,8	3,5	45,7	55,6	50,3	41,2	53,4
2,7	3,1	3,1	3,0	3,2	47,4	58,3	53,4	47,2	50,9
2,7	3,2	2,9	2,7	3,2	46,6	64,0	51,2	42,6	52,7
2,9	3,3	3,0	3,2	3,3	45,2	59,8	55,6	48,3	49,8
3,0	3,8	2,6	2,8	3,2	51,9	51,6	46,6	43,8	47,2
3,3	2,8	3,0	3,0	3,1	55,8	52,8	56,5	46,6	48,0
3,3	2,8	3,0	3,0	3,1	49,6	52,5	54,7	46,5	48,2
2,5	3,4	2,8	2,9	3,2	38,4	62,5	52,3	45,8	47,8
3,2	3,0	2,5	2,7	2,6	51,7	56,8	45,9	42,8	38,5
3,1	3,3	2,9	3,0	3,2	53,4	61,6	53,9	46,8	52,9
3,0	3,2	2,5	2,8	3,3	47,8	57,8	46,8	42,5	50,3
3,0	3,7	2,5	3,1	3,6	48,1	67,2	44,5	47,3	57,1
3,6	3,4	2,8	3,3	3,6	55,1	61,6	52,4	52,4	53,2
3,6	3,3	2,8	3,3	3,6	60,8	55,9	49,5	49,8	55,0
3,0	3,2	2,8	3,4	3,3	58,7	54,7	52,0	50,8	50,2
3,3	3,7	2,8	3,0	3,7	51,5	64,7	49,6	46,6	58,3
					Mittel:				
3,14	3,21	2,77	3,04	3,30	50,62	58,44	50,79	46,93	50,50

Vom 28. Juni bis 17. Juli 1923. Ersatzperiode II.

Fettprozente					Fettmenge in g				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
3,2	3,3	3,0	3,1	3,2	54,4	55,3	53,5	48,4	46,4
3,4	3,1	2,9	3,2	3,4	56,8	55,3	54,9	50,1	55,8
3,2	3,2	2,6	3,0	3,0	56,9	58,7	48,8	49,2	49,2
3,3	3,3	2,6	2,7	2,7	59,1	62,1	52,6	45,6	44,3
3,4	3,3	2,3	2,5	2,0	56,9	58,1	43,8	40,5	33,6
3,4	3,2	2,6	2,9	2,5	61,2	60,2	51,8	49,6	40,5
3,4	3,1	3,0	2,9	3,1	60,1	60,7	60,4	49,3	50,5
3,0	2,8	3,1	2,9	3,0	53,8	55,7	61,4	50,9	47,9
3,1	3,2	2,7	2,9	3,5	56,6	63,9	50,8	51,0	26,2
3,4	3,0	3,1	3,2	3,3	60,5	59,7	59,5	53,3	23,1
3,4	3,0	3,1	3,2	3,3	62,3	57,9	63,4	58,7	45,6
3,0	3,0	2,7	3,0	2,5	55,0	58,6	51,0	52,8	39,8
2,9	3,1	2,6	3,0	3,1	53,2	58,8	52,0	53,5	43,5
3,4	3,5	2,6	2,6	3,1	61,3	61,5	51,0	47,0	41,3
2,9	4,0	2,7	3,0	3,2	52,1	69,5	53,4	54,8	46,3
2,9	3,6	3,0	3,0	3,2	55,6	62,8	54,9	53,7	47,2
3,1	3,6	3,1	2,8	3,3	57,0	61,8	56,7	52,4	46,7
3,1	3,7	3,5	2,6	3,5	58,6	64,8	62,8	46,9	45,7
2,8	3,6	3,2	2,6	3,1	51,3	63,9	59,8	47,1	44,8
2,8	3,6	3,1	2,6	3,4	51,8	62,9	58,7	46,6	48,1
					Mittel:				
3,06	3,34	2,96	2,88	—	56,09	61,68	56,57	51,52	—

Vom 18. Juli bis 8. August 1923. Grundfutterperiode II.

Fettprozente					Fettmenge in g				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
2,0	3,5	2,8	2,6	3,3	32,9	63,1	54,2	47,5	46,8
2,4	3,5	2,6	3,0	3,2	39,8	63,3	44,3	50,9	42,9
2,6	3,5	3,0	3,0	3,1	40,4	60,3	53,2	46,5	41,7
2,7	3,6	2,9	3,0	3,4	44,1	63,2	50,1	48,8	44,1
2,8	3,7	2,8	3,0	3,3	43,5	60,2	47,1	47,6	40,4
2,7	3,5	3,0	3,1	3,1	40,8	56,9	51,5	49,2	36,7
2,7	3,1	2,7	3,2	3,5	41,1	52,5	45,7	46,7	45,9
3,2	3,5	3,0	3,3	3,5	48,3	56,7	51,8	48,9	41,7
3,2	3,8	2,8	3,5	3,6	47,5	60,6	46,8	51,9	42,3
3,5	3,8	2,5	3,2	3,8	52,8	56,1	43,2	45,5	43,7
2,7	3,8	2,4	3,2	3,8	34,9	59,2	40,1	46,5	40,9
2,8	3,6	3,0	3,3	3,6	37,9	56,0	52,6	45,1	38,6
3,5	3,6	2,6	3,2	4,0	50,4	54,9	40,9	45,5	45,2
3,2	3,6	2,6	3,2	3,9	41,8	56,3	44,9	41,7	46,9
3,3	3,6	2,6	3,2	3,9	43,4	53,1	40,1	44,2	43,7
3,7	3,6	2,7	3,1	4,1	50,5	54,9	44,7	41,5	49,1
3,3	3,5	2,7	3,0	3,4	40,5	52,7	43,3	41,4	37,8
3,4	3,6	3,0	3,0	4,0	40,9	51,8	46,3	41,3	43,1
3,6	3,3	2,5	3,1	4,0	44,8	48,1	38,9	39,3	40,0
3,9	3,4	2,8	3,1	3,9	45,7	43,6	40,8	33,2	40,1
3,0	3,5	2,6	3,0	3,5	32,2	52,7	42,9	37,3	42,9
3,8	3,5	2,8	3,0	3,7	44,7	49,7	40,1	39,7	42,0
Mittel:									
3,34	3,58	2,71	3,15	3,78	43,76	53,77	43,83	42,88	42,53

Vom 9. bis 28. August 1923. Ersatzperiode III.

Fettprozente					Fettmenge in g				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
3,8	3,6	2,7	3,1	3,7	45,8	51,5	41,6	38,9	44,6
3,5	3,2	2,6	2,7	3,5	40,2	47,5	39,4	35,2	40,7
3,5	3,2	2,5	2,7	3,0	39,5	47,7	37,9	35,3	36,7
3,5	3,4	2,6	2,7	3,0	39,7	50,9	39,3	35,6	38,7
3,5	3,1	2,6	2,5	2,8	38,7	44,9	38,6	33,7	32,1
3,3	3,4	2,6	2,6	2,9	35,2	46,6	34,2	33,0	35,3
3,0	3,2	2,7	2,9	2,6	32,0	45,2	38,4	36,9	20,0
3,1	3,2	2,4	2,7	3,0	32,1	46,5	34,6	37,1	38,6
3,1	3,3	2,8	2,7	3,0	36,1	45,1	41,2	34,2	33,5
2,8	3,3	2,1	3,7	3,0	27,9	50,7	29,5	37,1	38,9
2,9	2,9	2,5	2,6	2,8	27,5	43,0	37,9	35,4	34,5
3,3	3,0	2,2	2,3	2,8	29,4	39,8	29,4	30,9	31,7
3,8	3,1	2,5	2,5	2,8	34,7	47,1	35,5	33,5	33,9
3,0	3,2	2,7	2,5	2,8	24,8	43,6	37,8	33,4	32,6
3,2	3,1	2,3	2,5	2,8	28,4	46,3	32,1	36,6	38,4
3,1	3,4	2,4	2,6	3,0	26,2	45,8	32,5	36,0	36,0
2,7	3,3	2,3	2,3	2,4	22,1	42,6	32,5	33,2	31,3
3,7	3,2	2,3	2,3	2,5	33,8	33,6	32,8	31,2	30,0
2,8	3,3	2,4	2,5	3,0	19,9	44,6	32,7	34,3	35,1
2,8	3,2	2,4	2,5	2,6	22,1	44,8	31,9	33,8	31,8
Mittel:									
3,11	3,20	2,41	2,51	2,81	28,08	44,10	33,87	34,36	34,31

Vom 29. August bis 14. September 1923. Ersatzperiode IV.

Fettprozente					Fettmenge in g				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
2,7	2,9	2,1	2,5	2,7	26,9	40,9	26,2	31,6	30,8
2,7	2,9	2,1	2,5	2,7	25,1	45,2	31,9	36,0	34,3
2,8	2,6	2,2	2,3	2,3	28,8	40,0	32,3	36,3	32,5
2,8	2,7	2,3	2,2	2,2	30,4	42,6	35,5	35,0	33,3
2,8	2,7	2,4	2,2	2,2	28,7	43,0	36,4	34,2	29,0
2,8	2,7	2,4	2,2	2,2	27,8	43,8	37,5	33,8	29,3
2,8	2,9	2,4	2,3	2,2	24,5	45,3	35,9	34,3	30,5
2,8	2,9	2,5	2,4	2,2	25,8	44,5	37,5	36,7	32,1
2,5	2,9	2,6	2,7	2,3	23,0	45,4	38,6	41,6	29,7
2,5	2,9	2,6	2,8	2,4	25,5	43,6	38,6	42,6	32,6
2,7	2,9	2,3	2,9	2,5	24,9	44,9	34,6	45,7	32,9
2,5	2,9	2,3	2,9	2,4	24,6	46,1	33,2	44,4	31,0
2,5	2,9	2,3	2,9	2,3	24,9	45,8	33,4	47,7	31,2
2,7	2,9	2,3	2,9	2,4	28,4	45,3	34,6	48,0	32,8
2,8	2,9	2,3	2,4	2,4	26,6	45,5	33,2	41,0	34,1
3,0	2,3	2,3	2,4	2,4	25,2	46,5	35,3	40,1	30,3
3,3	2,3	2,4	2,3	2,3	28,2	45,8	36,0	38,8	30,6
Mittel:									
2,73	2,97	2,38	2,66	2,35	25,69	45,33	35,49	42,66	31,71

Vom 15. bis 30. September 1923. Grundfutterperiode III.

Fettprozente					Fettmenge in g				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
3,0	3,4	2,5	2,6	2,4	24,9	48,4	35,9	41,7	30,5
3,1	3,8	2,9	3,1	2,5	26,8	51,9	38,6	46,9	33,5
3,1	3,9	3,0	3,2	3,0	25,7	48,5	37,3	42,8	36,1
3,5	4,1	3,0	3,4	3,4	26,4	50,9	37,3	45,5	43,1
3,5	4,1	3,2	3,4	3,4	26,5	51,9	37,0	42,5	46,5
3,8	4,7	3,2	3,7	3,4	28,0	55,9	35,6	48,7	41,6
3,8	4,3	3,2	3,7	3,4	28,6	52,6	37,3	46,1	43,4
3,5	4,5	3,3	3,9	3,4	24,7	50,4	35,3	45,5	41,7
3,4	4,6	3,2	4,0	3,4	25,1	52,8	37,0	48,7	39,4
4,3	4,6	3,4	4,1	3,4	28,8	51,7	36,8	50,2	40,4
4,0	4,7	3,7	4,0	4,0	31,2	50,7	39,9	48,6	44,6
4,0	4,7	3,6	4,0	4,2	26,0	48,5	38,7	48,3	45,2
3,9	4,7	3,5	4,0	3,9	26,8	46,0	36,0	43,8	42,8
4,2	4,6	3,6	3,9	4,0	29,0	44,7	36,4	43,6	43,7
4,3	4,7	3,6	3,8	3,9	26,7	44,4	36,7	43,1	43,7
4,4	4,7	3,7	3,9	4,0	26,9	43,6	37,3	42,6	43,8
Mittel:									
3,99	4,64	3,51	3,95	3,79	27,25	48,09	37,12	46,05	42,81

Trockensubstanzprozente und -menge der Milch.

Vom 19. Mai bis 7. Juni 1923. Grundfutterperiode I.

Trockensubstanzprozente					Trockensubstanzmenge in g				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
11,0	11,0	10,4	10,5	11,5	214,6	205,5	191,8	180,9	186,1
10,3	11,7	10,5	10,4	11,5	194,9	242,2	204,1	175,9	171,7
10,3	11,4	10,8	11,0	11,2	188,0	226,0	189,9	190,0	166,0
10,4	12,3	9,8	11,8	10,3	198,9	248,5	183,7	213,5	151,0
10,4	12,7	10,9	10,6	11,3	179,2	274,4	206,4	184,9	168,9
11,3	9,2	11,0	11,0	11,1	210,5	217,5	201,3	196,4	163,6
11,2	11,6	10,8	10,4	11,2	216,3	265,8	196,9	181,2	150,7
10,6	11,1	10,5	10,5	11,2	193,8	254,9	206,8	185,7	168,5
10,3	11,2	11,6	10,1	11,3	203,8	253,7	215,4	175,6	175,0
10,6	11,3	10,7	10,6	11,0	181,6	259,8	205,7	178,8	161,9
11,2	11,3	10,9	10,5	10,8	203,0	255,5	197,5	174,2	164,3
11,1	11,3	11,2	10,6	11,6	216,0	255,7	203,7	178,8	190,1
10,8	11,3	10,5	11,3	11,2	190,2	252,8	204,6	192,0	166,8
10,6	11,7	10,9	10,5	10,9	179,1	244,1	189,8	171,2	166,3
11,1	10,9	10,7	10,5	11,3	190,5	232,2	185,6	163,6	186,6
11,3	10,6	10,5	10,2	11,3	219,2	226,7	185,7	168,7	187,2
10,3	10,9	10,4	10,6	11,3	184,9	225,3	182,9	171,6	171,0
10,6	11,5	10,8	10,3	11,1	176,9	226,2	185,9	148,6	172,8
10,9	11,7	10,9	10,9	11,5	186,0	225,0	196,8	162,3	171,0
11,0	11,4	10,7	10,4	11,6	197,3	221,4	184,6	149,1	176,5
					Mittel:				
10,80	11,24	10,80	10,53	11,23	194,0	241,2	195,8	170,8	173,7

Vom 8. bis 27. Juni 1923. Ersatzperiode I.

Trockensubstanzprozente					Trockensubstanzmenge in g				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
11,1	11,7	11,1	10,8	11,3	201,5	217,4	195,0	158,0	164,3
10,9	11,6	10,8	10,7	11,5	192,7	235,0	191,2	162,8	173,9
10,4	10,2	9,7	9,6	10,3	185,3	198,9	173,9	144,0	152,1
11,2	11,5	10,6	10,8	11,6	183,8	225,0	187,6	161,0	175,7
11,3	11,6	9,6	9,4	11,9	184,4	219,8	163,2	140,7	180,9
11,3	10,9	10,6	9,8	10,8	197,7	204,2	191,7	154,9	156,3
11,3	11,8	10,8	11,2	11,4	194,7	232,5	189,9	176,3	187,8
11,4	11,7	11,3	11,2	11,6	177,5	215,6	209,7	165,9	174,9
11,8	11,9	11,2	11,4	11,4	205,8	223,7	200,2	175,2	168,2
11,3	11,7	11,0	11,4	11,4	191,0	220,8	206,4	176,8	176,2
11,3	11,7	11,0	11,4	11,4	169,8	219,5	199,5	176,1	176,7
10,8	10,7	10,9	11,2	10,3	165,5	196,3	204,3	173,4	154,1
11,8	12,0	10,9	11,5	11,2	190,8	228,2	200,4	182,4	165,5
9,9	9,0	9,3	9,8	10,4	169,8	167,3	173,7	152,9	171,2
11,0	11,8	10,3	11,2	11,3	174,5	211,9	193,6	173,2	172,6
11,3	11,9	10,4	11,4	10,7	181,3	216,5	185,1	173,8	169,7
12,1	11,7	10,8	11,3	11,6	185,7	212,6	201,8	179,5	169,2
12,1	11,7	10,8	11,3	11,6	204,8	198,8	190,7	170,8	175,1
11,6	11,7	10,9	11,4	11,5	188,8	202,9	198,9	170,6	175,3
11,5	11,9	10,9	11,6	12,0	179,8	208,9	192,4	179,5	188,5
					Mittel:				
11,37	11,51	10,74	11,23	11,25	183,5	209,5	196,7	173,1	172,1

Vom 28. Juni bis 17. Juli 1923.
Ersatzperiode II.

Trockensubstanzprozente					Trockensubstanzmenge in g				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
12,2	12,0	11,0	11,5	11,7	206,5	200,5	195,8	179,6	169,8
10,3	11,3	9,5	10,9	20,0	171,7	202,1	177,4	170,1	180,1
11,0	11,3	9,8	11,1	10,8	195,6	207,5	192,2	182,5	177,6
10,9	11,4	10,3	11,0	10,8	195,1	214,5	204,3	182,3	177,8
10,8	11,1	10,6	10,7	11,4	180,6	195,5	206,2	177,2	191,5
11,2	11,2	10,7	10,3	11,1	200,9	210,7	213,3	176,3	179,5
10,4	10,1	10,0	10,9	10,9	183,6	196,7	201,2	185,1	177,9
11,8	11,2	10,7	11,3	11,3	211,1	222,5	211,5	198,4	183,8
11,5	11,3	10,8	11,3	12,6	210,6	225,1	202,9	202,5	94,3
11,0	11,5	11,0	11,4	11,5	195,4	229,2	210,8	189,8	80,3
11,0	11,5	11,0	11,4	11,5	201,1	222,6	224,5	209,2	158,5
10,9	10,5	10,1	10,4	10,7	199,6	206,1	190,3	182,7	170,9
10,7	12,0	10,3	10,7	11,5	197,0	227,3	205,1	191,4	160,5
11,5	12,2	10,5	11,3	12,4	207,5	214,3	209,8	204,5	164,8
11,0	12,0	11,0	10,8	11,4	198,4	208,6	213,5	196,8	165,2
11,6	11,6	11,0	11,1	11,6	222,0	201,5	201,5	199,2	171,0
11,0	11,8	10,9	10,5	11,5	202,3	201,6	199,2	196,6	152,1
10,8	11,6	11,5	10,4	11,4	203,3	203,1	205,9	187,7	148,1
10,8	11,7	10,6	10,4	11,2	197,9	207,2	198,2	188,2	161,4
10,3	11,1	10,3	10,0	11,1	190,5	194,4	192,0	179,3	154,6
					Mittel:				
11,06	11,52	10,73	10,84	—	202,8	212,6	205,0	194,3	—

Vom 18. Juli bis 8. August 1924.
Grundperiode II.

Trockensubstanzprozente					Trockensubstanzmenge in g				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
9,9	11,6	10,5	10,4	11,1	162,9	208,5	203,5	186,8	157,4
10,7	11,5	10,4	10,9	10,4	177,8	208,1	180,2	185,6	139,1
10,9	11,6	10,6	10,9	11,1	169,3	199,9	187,9	169,4	149,8
10,6	11,3	10,3	10,3	9,4	173,9	198,2	180,3	167,2	122,0
11,0	11,6	10,1	10,0	10,9	167,6	189,2	170,8	158,7	133,4
10,4	11,2	10,5	10,8	10,8	157,0	182,2	180,3	171,2	129,9
10,8	11,4	9,6	10,0	10,1	164,4	192,5	161,7	145,2	133,1

Im Mittel von 15 Tagen dieser **Periode:**
(für die Hauptperiode liegt nur die folgende **Mittelzahlenreihe** vor):

1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
10,63	10,93	9,88	10,20	11,10	139,3	164,1	159,6	138,7	124,8

Vom 9. bis 28. August 1923. Ersatzperiode III.

Trockensubstanzprozente					Trockensubstanzmenge in g				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
11,6	11,0	10,2	10,8	12,4	139,8	157,3	156,9	135,3	148,8
11,5	11,0	10,1	10,8	11,5	132,0	162,8	153,6	140,2	134,3
11,5	11,1	10,2	10,7	11,5	129,3	165,7	154,5	139,5	140,8
11,5	11,1	10,3	10,7	11,5	129,7	166,7	155,5	140,8	148,1
11,5	11,6	10,4	10,8	11,1	127,4	167,1	153,9	144,9	127,7
11,2	11,0	10,4	10,4	11,0	119,4	150,0	136,1	131,9	133,5
11,3	11,4	10,2	10,8	11,1	120,6	161,0	141,0	137,2	128,3
11,4	11,0	10,0	10,7	10,9	118,3	159,4	143,4	147,6	140,2
11,6	10,8	10,2	10,6	11,6	134,9	147,4	150,0	134,2	138,8
11,2	11,4	10,0	11,0	11,6	114,3	147,5	140,0	150,6	149,7
11,6	11,4	10,4	10,8	11,6	110,2	168,3	156,9	146,4	142,3
12,0	11,4	10,2	10,8	11,8	106,5	150,6	135,9	144,6	135,6
12,6	11,4	10,2	10,6	11,5	114,5	172,7	144,8	141,9	136,3
12,0	11,6	10,4	10,7	11,2	99,2	154,8	145,4	146,6	130,1
12,0	11,4	10,2	10,8	11,4	106,5	170,5	141,6	154,7	155,9
11,6	11,9	10,1	10,5	11,5	97,7	159,6	134,5	145,3	138,2
11,3	12,0	10,2	10,4	10,8	92,2	151,9	144,1	150,3	137,3
12,0	11,6	10,3	10,3	11,2	108,5	121,5	146,9	145,4	134,3
10,8	11,6	10,2	10,8	11,4	76,9	154,5	138,7	147,1	133,1
12,0	11,6	10,4	10,8	11,2	94,7	162,3	137,9	145,6	136,7
Mittel:									
11,70	11,43	10,20	10,66	11,33	105,7	157,5	143,1	146,2	137,3

Vom 29. August bis 14. September 1923. Ersatzperiode IV.

Trockensubstanzprozente					Trockensubstanzmenge in g				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
11,8	11,7	10,6	11,0	11,4	117,2	165,3	132,1	138,4	129,8
11,2	11,2	10,0	10,4	11,0	103,8	174,6	151,9	149,9	139,3
11,0	10,6	10,0	10,3	10,6	113,0	162,9	146,6	163,2	149,7
11,1	11,0	10,2	10,5	10,8	118,6	172,9	157,0	166,8	162,5
11,0	10,6	9,8	10,7	10,3	112,8	168,9	148,8	166,8	162,5
11,4	10,9	10,2	10,4	10,2	113,4	177,4	159,0	160,0	135,1
11,4	11,4	10,2	10,6	11,1	101,2	177,9	155,4	157,7	153,1
11,3	*11,6*	10,4	10,6	10,7	106,0	178,0	158,8	162,2	155,8
11,2	*11,6*	10,2	11,1	10,7	103,0	181,0	151,0	171,4	141,4
11,0	*11,3*	10,2	11,2	11,6	101,7	170,4	150,7	169,8	141,0
11,3	11,4	10,1	11,2	11,1	104,0	176,0	155,7	175,8	143,1
11,1	11,2	10,2	11,2	11,0	108,1	177,2	146,6	170,8	142,3
11,0	11,4	10,2	11,1	10,7	111,5	179,1	147,7	182,9	144,4
11,2	11,2	10,2	10,7	10,8	115,4	174,9	152,9	176,5	147,5
11,5	11,4	10,3	10,6	10,8	111,1	178,7	149,1	181,1	153,2
11,6	11,6	10,2	10,7	10,8	97,2	164,0	155,9	178,3	142,3
11,7	11,8	10,2	10,7	10,8	100,1	163,1	153,1	180,1	143,0
Mittel:									
11,26	11,43	10,20	10,89	10,79	105,8	174,2	152,2	174,9	145,4

Vom 15. bis 30. September 1923. Grundfutterperiode III.

Trockensubstanzprozente					Trockensubstanzmenge in g				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
11,6	11,6	10,4	10,7	11,5	96,1	163,2	149.5	171,3	146,1
11,6	11,7	10,9	10,9	10,7	100,0	161,8	145,2	165.3	143,2
12,3	12,4	11,2	11,2	11,4	101,7	154,0	138,1	149,7	137,1
11,2	12,6	11,1	11,5	11,6	84,2	155.9	133,8	151.7	146.7
11,4	12,5	11,3	12,2	11,4	86,3	157,5	130,9	150,1	156.2
11,2	12,4	11,2	11,5	11,3	82,6	147.3	124,4	151,4	138.7
11,8	13,4	11,4	12,3	12,0	88,5	163,3	132,7	153,6	152.9
11,8	13,4	11,4	12,3	12,0	82,8	149,4	121,4	143.2	147,0
11,8	13,3	11,3	12,2	12,0	86,8	152,7	130,2	148,6	138,8
11,7	13,2	11,2	12.2	12,0	78,7	147,8	121,1	149,5	142.5
12,5	13,5	11,6	12,2	12,6	96,9	145,8	125,2	148,2	140,0
12,6	13,4	11,6	12,2	12,4	82,1	138,2	124,5	146,9	133,8
12,8	13,3	11,5	12,2	12,0	87,6	129,9	118,5	133,2	131,8
12,0	13,2	12,0	12,6	12,6	82,9	128,1	121,4	140,5	137.6
12,7	13,4	11,9	12,4	12,5	78,7	126,2	121,3	140,3	139,9
Mittel:									
12,37	13.49	11,61	12,35	12,29	84,6	139,8	122,9	143,8	138.9

Tägliche Milchmenge in g.

Grundfutterperiode I					Ersatzfutterperiode I				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1946	1790	1841	1716	1622	1815	1935	1757	1470	1457
1889	2079	1936	1696	1496	1763	2033	1775	1522	1507
1818	1988	1767	1734	1482	1785	1960	1802	1508	1480
1920	2015	1878	1817	1460	1635	1953	1778	1495	1520
1730	2157	1895	1750	1491	1632	1895	1704	1497	1527
1863	2364	1837	1792	1470	1754	1882	1812	1575	1454
1931	2295	1832	1751	1456	1725	1970	1767	1577	1647
1827	2295	1968	1792	1507	1560	1841	1852	1487	1510
1975	2275	1865	1735	1545	1732	1877	1792	1537	1475
1713	2295	1915	1690	1472	1692	1887	1885	1555	1550
1819	2255	1812	1662	1527	1504	1876	1822	1549	1554
1953	2257	1812	1693	1642	1535	1838	1868	1552	1493
1760	2245	1947	1698	1495	1617	1895	1837	1585	1480
1690	2090	1735	1627	1520	1723	1867	1860	1560	1654
1715	2140	1728	1552	1650	1592	1807	1872	1546	1525
1935	2143	1777	1652	1663	1602	1815	1780	1525	1587
1795	2063	1755	1620	1517	1531	1812	1872	1587	1457
1667	1970	1725	1437	1555	1698	1695	1769	1510	1508
1705	1930	1805	1488	1488	1622	1737	1823	1495	1495
1795	1935	1728	1430	1527	1562	1702	1770	1554	1575
Mittel:									
1796	2145	1813	1621	1547	1613	1819	1831	1542	1530

Ersatzfutterperiode II					Grundfutterperiode II				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1700	1675	1785	1560	1450	1647	1802	1936	1793	1417
1670	1785	1860	1565	1640	1660	1808	1739	1698	1341
1778	1833	1953	1640	1640	1555	1722	1774	1550	1346
1790	1882	1984	1657	1640	1635	1757	1757	1626	1298
1675	1760	1945	1655	1680	1525	1628	1684	1587	1225
1800	1880	1992	1712	1620	1510	1627	1717	1587	1203
1769	1959	2012	1700	1629	1522	1693	1692	1458	1313
1795	1990	1980	1757	1625	1510	1620	1727	1484	1190
1827	1997	1882	1792	749	1485	1595	1673	1482	1175
1780	1990	1920	1665	700	1510	1475	1727	1420	1149
1832	1932	2045	1835	1382	1295	1559	1672	1453	1078
1833	1955	1890	1760	1593	1353	1535	1753	1568	1071
1836	1897	1999	1782	1402	1442	1527	1572	1423	1131
1803	1738	2000	1808	1332	1307	1565	1693	1304	1203
1797	1745	1941	1826	1447	1315	1517	1544	1381	1120
1917	1716	1832	1790	1477	1365	1527	1654	1340	1198
1839	1751	1828	1872	1416	1227	1505	1605	1379	1112
1889	1774	1794	1805	1305	1205	1437	1544	1378	1077
1832	1757	1870	1811	1444	1243	1458	1557	1267	1000
1850	1447	1864	1793	1393	1171	1281	1459	1185	1027
—	—	—	—	—	1073	1506	1617	1242	1228
—	—	—	—	—	1160	1420	1431	1292	1120
Mittel:									
1833	1845	1911	1792	—	1311	1502	1615	1360	1125

Ersatzfutterperiode III					Ersatzfutterperiode IV				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1205	1430	1540	1254	1205	995	1409	1247	1263	1141
1149	1483	1515	1303	1165	930	1559	1521	1441	1269
1129	1490	1515	1306	1224	1028	1540	1469	1578	1414
1133	1498	1510	1318	1290	1068	1578	1545	1589	1513
1105	1447	1485	1347	1147	1026	1593	1515	1555	1317
1066	1369	1314	1269	1216	993	1623	1562	1536	1330
1067	1412	1421	1273	1152	889	1562	1527	1491	1386
1035	1453	1441	1374	1286	937	1535	1530	1530	1460
1165	1365	1471	1266	1115	921	1567	1486	1540	1321
1017	1537	1406	1375	1296	927	1504	1483	1523	1329
948	1483	1514	1361	1232	922	1547	1536	1577	1289
891	1325	1337	1343	1154	983	1588	1443	1532	1291
912	1519	1420	1339	1188	1015	1578	1454	1643	1355
827	1340	1401	1365	1164	1032	1562	1505	1654	1366
889	1492	1394	1435	1370	966	1570	1442	1709	1421
844	1346	1326	1384	1201	839	1409	1534	1671	1315
817	1271	1413	1445	1276	854	1387	1498	1686	1329
902	1051	1427	1416	1199	—	—	—	—	—
712	1332	1362	1372	1169	—	—	—	—	—
789	1401	1330	1350	1221	—	—	—	—	—
Mittel:									
903	1378	1403	1371	1221	940	1524	1491	1607	1348

Grundfutterperiode III. Menge in g				
1	2	3	4	5
829	1402	1437	1602	1272
865	1384	1440	1512	1339
830	1244	1235	1338	1203
753	1242	1205	1319	1267
757	1265	1157	1231	1367
738	1190	1111	1314	1223
753	1223	1166	1246	1276
705	1119	1070	1167	1227
739	1148	1155	1218	1158
670	1124	1081	1225	1189
779	1078	1079	1215	1115
650	1032	1075	1207	1077
687	979	1028	1096	1098
691	972	1012	1117	1092
620	945	1020	1134	1120
612	928	1009	1092	1095
Mittel:				
684	1036	1059	1163	1130

Trockensubstanzprozente und -menge des lufttrockenen Kotes.
Grundfutterperiode I.

Prozente				Menge in g			
1	2	3	4	1	2	3	4
35,0	37,0	36,3	32,5	430,5	673,4	580,8	520,0
35,0	37,5	30,6	32,6	416,5	570,0	557,5	560,5
34,7	42,7	39,4	33,1	537,8	649,0	665,9	540.0
38,6	38,4	33,6	34,2	649,3	545,7	561,6	516,6
34,8	38,8	35,4	35,1	577,2	545,9	612,1	546,8
34,9	36,5	34,5	34,5	580,3	668,5	596,2	592,7
39,5	37,0	35,9	32,2	596,5	676,9	643,3	628,3
33,1	35,7	32,2	32,5	516,7	641,9	606,1	594,0
36,2	35,7	32,0	33,3	589,9	581,9	589,2	596,8
33,8	35,7	31,2	33,4	513,3	666,8	577,6	661,3
35,2	38,2	32,5	32,3	542,2	614,4	610,1	629,1
35,1	34,7	32,1	29,8	523,4	637,6	642,4	602,0
31,6	33,0	36,3	31,5	603,2	580,3	576,4	487,8
32,2	32,2	30,4	30,1	470,4	567,1	535,7	667,1
33,1	33,3	31,9	30,9	565,2	613,5	587,1	577,5
34,0	33,2	32,7	32,4	557,3	611,1	562,6	566,3
33,6	34,1	32,2	32,6	561,0	638,4	652,8	469,3
34,8	35,1	32,4	34,8	560,3	586,4	583,6	706,0
33,1	33,4	31,8	33,5	562,7	604,5	588,9	582,4
34,5	32,5	31,3	32,1	521,3	611,8	594,9	496,8
Mittel:							
33,89	34,36	32,24	32,22	545,1	611,9	592,9	587,4

Ersatzfutterperiode I.

Prozente				Menge in g			
1	2	3	4	1	2	3	4
35,3	34,7	31,5	33,6	507,7	624,6	611,5	638,8
34,9	35,5	33,0	33,5	572,5	646,1	614,6	589,1
36,8	37,7	33,1	34,9	552,6	599,6	568,6	610,8
38,6	37,9	34,5	35,2	540,1	584,1	566,5	587,8
36,8	38,6	33,4	37,8	536,7	559,1	527,7	529,5
38,5	37,1	33,1	34,6	519,8	601,5	558,7	512,5
35,8	38,3	33,5	36,0	383,2	601,2	553,4	648,7
36,4	37,9	34,9	35,1	538,9	583,8	649,9	568,3
35,0	35,6	36,1	34,5	469,4	547,5	613,0	544,3
37,2	37,8	34,2	35,6	458,0	594,1	604,8	554,9
38,3	40,5	35,0	35,6	472,9	587,7	587,2	626,4
36,2	36,5	33,0	35,0	420,3	584,6	554,7	566,7
37,4	34,5	33,1	35,4	504,8	602,9	622,3	636,8
36,9	34,4	33,5	34,3	524,1	540,6	579,4	565,3
38,4	39,0	33,8	34,5	483,8	681,9	608,9	603,9
38,4	38,0	33,9	34,3	499,1	614,9	607,7	693,3
38,4	36,3	34,1	34,0	460,4	551,6	596,1	533,0
38,8	35,5	34,0	34,2	563,0	528,5	588,7	591,0
38,8	36,6	32,7	34,2	582,2	581,1	594,8	603,2
38,1	35,7	34,2	34,8	502,7	607,4	595,6	601,7
Mittel:							
37,57	36,79	34,04	34,70	498,4	585,1	600,2	591,4

Ersatzfutterperiode II.

Prozente				Menge in g			
1	2	3	4	1	2	3	4
38,1	35,7	35,3	35,7	388,9	496,5	511,7	535,8
39,5	38,3	37,0	40,0	516,8	497,9	591,7	527,7
39,0	38,6	38,6	40,6	479,7	502,1	624,8	552,2
40,0	40,7	37,8	42,5	511,6	557,0	589,8	594,9
38,1	42,3	37,3	39,1	423,0	448,2	503,0	519,6
44,8	39,3	37,5	43,5	496,9	502,9	558,3	456,2
44,4	37,7	35,7	38,9	568,3	637,8	611,1	564,1
44,0	43,6	36,9	39,2	514,6	640,3	531,2	651,2
45,4	40,7	38,4	41,9	503,8	667,3	506,7	691,3
45,4	40,7	38,4	41,9	503,8	703,9	502,9	695,5
44,3	43,8	39,4	40,3	474,3	482,8	504,3	551,6
42,5	42,1	39,9	39,5	493,5	711,3	519,1	572,5
43,3	40,2	39,8	41,0	454,6	711,0	541,1	565,5
41,3	38,7	41,1	42,2	532,4	576,3	624,0	657,8
41,0	38,5	37,6	42,6	507,9	490,1	563,4	553,8
42,4	35,3	36,4	43,6	487,4	525,4	572,0	593,1
42,7	37,4	37,0	41,9	486,6	597,6	614,2	649,6
43,8	42,4	37,3	42,6	481,7	513,5	603,5	613,9
46,2	43,0	38,9	41,9	462,0	705,9	617,7	632,7
47,7	43,8	39,1	41,5	514,6	644,4	578,8	626,6
Mittel:							
43,14	40,78	38,54	41,54	493,6	613,3	559,9	619,6

Grundfutterperiode II.

Prozente				Menge in g			
1	2	3	4	1	2	3	4
45,8	41,7	38,1	40,2	494,6	560,0	605,1	607,0
38,9	43,6	37,2	35,3	501,8	553,7	523,8	677,9
35,9	39,6	32,6	33,9	459,3	605,6	571,2	508,2
35,5	37,8	35,2	34,0	500,1	691,7	577,3	612,0
36,4	36,7	32,9	34,0	440,1	660,1	519,4	615,6
38,4	40,2	32,2	36,2	422,0	578,6	566,7	654,5
36,2	35,6	31,5	37,2	565,0	727,1	557,6	607,0
Im Mittel von 15 Tagen der Periode:							
34,96	35,26	37,30	32,00	468,5	603,6	681,6	549,1

Ersatzfutterperiode III.

Prozente				Menge in g			
1	2	3	4	1	2	3	4
37,2	37,4	31,3	34,3	479,2	662,0	598,4	555,2
39,3	37,0	35,6	38,0	503,0	595,2	618,7	650,3
40,9	40,8	37,4	40,7	527,0	510,1	571,6	500,5
53,6	26,4	38,3	46,2	664,6	279,5	659,1	628,9
38,7	36,3	35,5	40,5	495,1	461,4	564,1	485,4
41,1	40,0	40,4	44,2	472,5	492,0	537,6	455,6
43,2	41,2	38,4	39,9	475,5	707,8	579,8	443,3
39,6	42,0	37,8	40,4	459,7	537,6	562,7	544,7
38,6	42,1	39,0	41,7	440,3	618,3	561,1	587,5
39,9	41,9	38,1	39,8	450,4	637,3	568,3	517,5
40,9	40,2	38,4	41,8	507,4	506,8	572,3	497,2
42,8	47,2	38,0	43,1	453,8	566,5	516,4	525,5
42,7	42,0	36,3	42,2	461,5	630,5	632,3	595,0
42,2	46,5	38,3	41,8	426,1	515,7	566,7	534,9
42,7	43,3	37,7	42,8	422,8	541,6	539,7	521,5
41,7	45,5	37,9	40,9	404,8	440,9	496,6	413,0
42,4	41,7	38,4	41,4	424,2	475,4	468,7	562,8
41,5	41,7	36,4	40,2	419,2	563,5	625,7	599,4
40,6	41,2	38,0	41,7	390,1	536,0	546,6	574,8
40,9	41,4	39,1	41,6	425,1	554,6	578,4	594,9
Mittel:							
41,28	42,83	37,95	41,50	437,3	548,1	556,1	543,7

Ersatzfutterperiode IV.

Prozente				Menge in g			
1	2	3	4	1	2	3	4
42,2	41,1	34,0	33,0	522,7	649,5	703,4	481,8
43,1	39,0	34,9	35,0	417,9	655,4	750,1	440,7
40,9	41,7	38,0	45,1	596,8	712,6	706,8	536,9
43,2	43,0	38,2	42,0	652,9	735,0	714,9	684,9
41,4	42,6	38,0	42,5	699,7	928,7	802,6	684,3
42,9	42,6	37,3	44,6	642,9	771,4	731,7	650,9
42,2	42,7	34,9	43,9	666,1	776,5	774,8	842,1
42,4	43,0	35,0	42,4	666,3	773,1	742,4	791,9
41,7	41,5	34,8	44,3	634,0	822,1	776,5	842,4
40,2	43,8	35,8	45,4	662,5	682,5	726,1	840,0
42,8	43,6	35,8	42,4	577,9	750,4	727,4	772,0
41,1	44,2	36,9	40,9	686,5	663,0	676,0	690,7
39,8	44,4	36,2	41,5	625,3	683,6	727,8	634,7
40,1	44,4	37,1	41,7	697,7	802,7	712,1	592,6
40,6	43,3	37,0	42,0	654,1	701,0	651,2	755,6
38,8	38,6	36,9	40,8	613,2	674,8	716,2	677,5
41,4	46,3	37,0	41,6	695,2	888,6	706,7	735,6
Mittel:							
40,86	43,27	36,21	42,36	651,3	744,2	716,2	733,3

Grundfutterperiode III.

Trockensubstanzprozente				Menge in g			
1	2	3	4	1	2	3	4
36,3	40,9	33,3	34,1	569,3	712,4	615,9	590,1
30,0	36,3	30,8	29,2	531,4	576,7	604,5	748,5
29,3	35,2	28,9	30,8	460,2	627,9	588,7	538,6
29,9	35,6	25,6	30,4	506,5	644,9	548,7	626,2
30,7	36,3	27,5	33,2	491,8	547,5	616,9	644,8
32,5	37,1	29,0	32,8	503,3	645,9	567,8	548,1
33,7	35,5	34,9	33,6	559,3	557,5	632,4	580,8
33,1	36,7	30,5	33,3	429,9	685,9	591,7	576,2
32,6	36,2	31,8	34,0	531,7	469,9	560,2	527,0
33,1	39,1	31,4	33,8	486,6	574,5	575,5	573,7
33,8	40,3	30,2	32,9	483,8	657,2	536,8	483,3
30,8	37,3	31,4	33,5	532,5	582,5	597,4	550,0
30,5	37,0	30,8	33,7	488,0	621,4	576,2	663,4
30,3	36,4	31,0	33,1	530,1	622,6	675,8	611,9
30,5	36,7	31,0	33,5	463,6	606,0	566,9	589,1
Mittel:							
31,80	37,45	31,02	33,47	493,2	602,5	585,1	564,3

Gewicht des frischen Kotes in Grammen (täglich gewogen).

Grundfutterperiode I.				Ersatzfutterperiode I.			
1	2	3	4	1	2	3	4
1230	1820	1600	1600	1440	1800	1940	1900
1190	1520	1820	1720	1640	1820	1860	1760
1550	1520	1690	1630	1500	1590	1720	1750
1680	1420	1670	1510	1400	1540	1640	1670
1610	1580	1630	1560	1460	1450	1580	1400
1660	1570	1730	1720	1350	1620	1690	1480
1510	1830	1790	1950	1080	1570	1650	1800
1560	1800	1880	1830	1480	1540	1860	1620
1630	1630	1840	1790	1340	1540	1700	1580
1520	1870	1850	1980	1230	1570	1770	1560
1540	1610	1880	1950	1240	1450	1680	1760
1490	1840	2000	2020	1160	1600	1680	1620
1910	1760	1590	1550	1350	1750	1880	1800
1460	1760	1840	2220	1420	1570	1730	1650
1710	1840	1720	1870	1260	1750	1800	1750
1640	1840	1720	1750	1300	1620	1790	2020
1670	1870	2030	1440	1200	1520	1750	1570
1610	1670	1800	2030	1450	1490	1730	1730
1700	1810	1850	1740	1500	1590	1820	1770
1510	1880	1900	1550	1320	1700	1740	1730
Mittel:							
1610	1785	1855	1825	1326	1591	1764	1705

Ersatzfutterperiode II.				Grundfutterperiode II.			
1	2	3	4	1	2	3	4
1020	1390	1450	1500	1080	1440	1590	1510
1310	1300	1600	1320	1290	1270	1410	1920
1230	1300	1620	1360	1280	1530	1750	1500
1280	1370	1560	1400	1410	1830	1640	1800
1110	1060	1350	1330	1210	1800	1580	1810
1110	1280	1490	1050	1100	1440	1760	1810
1280	1690	1710	1450	1560	1240	1770	1630
1170	1470	1440	1660	1290	1500	1870	1620
1100	1640	1300	1650	1280	1800	1890	1790
1110	1730	1330	1660	1290	1610	1650	1750
1070	1100	1280	1370	1430	1670	1870	1860
1160	1690	1300	1400	1350	1550	1850	1890
1050	1770	1360	1380	1310	1900	1830	1520
1290	1490	1520	1560	1360	1700	1770	1570
1240	1390	1500	1300	1320	1710	1840	1770
1150	1490	1570	1340	1070	1730	1870	1560
1140	1600	1660	1550	1490	1800	1810	1630
1100	1210	1620	1440	1440	1650	1800	1610
1000	1640	1590	1510	1480	1910	1960	1920
1080	1470	1480	1510	1180	1420	1740	1510
—	—	—	—	1540	1990	1870	1840
—	—	—	—	1280	1740	1790	1900
Mittel:							
1128	1514	1458	1487	1340	1712	1827	1716

Ersatzfutterperiode III.				Ersatzfutterperiode IV.			
1	2	3	4	1	2	3	4
1290	1770	1910	1620	1240	1580	2070	1460
1280	1610	1740	1710	970	1680	2150	1260
1290	1250	1530	1230	1460	1710	1860	1190
1240	1060	1720	1360	1510	1710	1870	1630
1280	1270	1590	1200	1690	2180	2110	1610
1150	1230	1330	1030	1500	1810	1960	1460
1100	1720	1510	1110	1580	1820	2220	1920
1160	1720	1490	1350	1570	1800	2120	1870
1140	1470	1440	1410	1520	1980	2230	1900
1130	1520	1490	1300	1650	1560	2030	1850
1240	1260	1470	1190	1350	1720	2030	1820
1060	1200	1360	1210	1670	1500	1830	1690
1080	1500	1740	1410	1570	1540	2010	1530
1010	1110	1480	1280	1740	1810	1920	1420
990	1250	1430	1220	1610	1620	1760	1800
970	970	1310	1010	1580	1750	1940	1660
1000	1140	1220	1360	1680	1920	1910	1770
1010	1350	1720	1440	—	—	—	—
960	1300	1440	1380	—	—	—	—
1040	1340	1480	1430	—	—	—	—
Mittel:							
1061	1284	1467	1307	1594	1720	1978	1731

Grundperiode III			
1	2	3	4
1570	1740	1910	1730
1770	1590	1960	2560
1570	1780	2040	1750
1690	1810	2140	2060
1600	1510	2240	1940
1550	1740	1960	1670
1660	1570	1810	1730
1300	1870	1940	1730
1630	1300	1760	1550
1470	1470	1830	1700
1430	1630	1780	1470
1730	1560	1900	1640
1600	1680	1870	1790
1750	1710	2180	1850
1520	1650	1830	1760
Mittel:			
1554	1609	1886	1686

Dieser frische Kot, bei 70° C 24 Stunden lang getrocknet, ergab den „Lufttrockenen Kot“, der zu den Analysen verwendet wurde, und dessen Menge in den Tabellen bereits niedergelegt ist. Als solcher besaß er immer noch

einen zwischen 2 bis 4 Proz. schwankenden Wassergehalt. Die wirkliche *Kottrockensubstanz* — bei 100° C getrocknet — zeigt folgende *Zusammensetzung* in Prozenten:

	Roh-protein	Rein-protein	Peps. HCl-unl. N-Subst.	Roh-fett	N-freie Extrakt-stoffe	Roh-faser	Asche	Org. Substanz	N
				Grundperiode I.					
Ziege 1 . .	12,2	11,0	8,6	2,9	42,2	27,0	15,6	84,4	1,9
„ 2 . .	12,1	10,9	8,6	2,7	41,4	28,1	15,7	84,3	1,9
„ 3 . .	12,8	10,9	8,5	2,9	41,5	25,7	17,0	83,0	2,1
„ 4 . .	11,9	10,5	8,1	2,8	41,7	27,8	15,8	84,2	1,9
				Ersatzperiode I.					
Ziege 1 . .	12,3	10,5	8,0	2,9	37,8	32,1	14,9	85,1	2,0
„ 2 . .	11,9	10,3	7,2	2,3	39,0	32,1	14,7	85,3	1,9
„ 4 . .	12,1	10,4	7,7	2,6	40,2	29,9	15,2	84,8	1,9
„ 3 . .	11,7	9,9	7,7	2,8	41,0	29,2	15,3	84,7	1,9
				Ersatzperiode II.					
Ziege 1 . .	12,8	11,2	8,2	2,7	40,8	30,4	13,4	86,7	2,0
„ 2 . .	12,2	11,5	8,2	2,5	41,7	29,9	13,7	86,3	1,9
„ 3 . .	12,4	10,8	7,8	2,3	41,6	30,0	13,7	86,3	2,0
„ 4 . .	12,1	11,2	8,2	2,3	43,0	29,0	13,6	86,4	1,9
				Grundfutterperiode II.					
Ziege 1 . .	11,8	10,7	8,7	2,4	44,4	25,9	15,5	84,5	1,9
„ 2 . .	12,0	10,4	8,7	2,6	40,9	29,2	15,2	84,8	1,9
„ 3 . .	12,7	11,0	8,5	2,7	41,7	27,2	15,7	84,3	2,0
„ 4 . .	12,0	10,5	8,6	2,3	39,3	30,6	15,8	84,2	1,9
				Ersatzfutterperiode III.					
Ziege 1 . .	11,9	10,9	8,8	2,3	45,1	27,0	13,7	86,3	1,9
„ 2 . .	11,4	10,9	8,0	2,3	46,0	26,9	13,4	86,6	1,8
„ 3 . .	12,3	11,7	8,7	2,1	44,9	26,8	13,9	86,1	2,0
„ 4 . .	11,5	10,6	7,6	2,6	44,5	27,7	13,7	86,3	1,8
				Ersatzperiode IV.					
Ziege 1 . .	16,3	14,5	10,8	4,1	38,3	28,7	12,6	87,4	2,6
„ 2 . .	15,3	13,6	9,6	3,7	39,5	29,1	12,5	87,5	2,4
„ 3 . .	16,9	14,5	9,9	4,2	39,8	26,5	12,6	87,4	2,7
„ 4 . .	16,4	14,5	10,3	4,3	39,7	27,5	13,1	87,9	2,6
				Grundperiode III.					
Ziege 1 . .	11,6	10,5	8,9	2,3	43,3	27,4	15,4	84,6	1,9
„ 2 . .	11,5	10,6	8,3	2,7	42,4	27,8	15,6	84,4	1,8
„ 3 . .	13,7	11,3	8,5	3,1	42,0	26,6	14,6	85,4	2,0
„ 4 . .	11,3	10,7	8,1	3,3	43,4	26,4	15,6	84,4	1,8

Harnausscheidung.

Grundfutterperiode I.

Harnmenge in Liter angegeben				N im Harn, in g			
1	2	3	4	1	2	3	4
2,0	4,3	2,3	1,5	13,9	16,9	18,4	16,8
1,5	3,8	2,5	1,4	15,0	17,3	24,0	16,7
2,0	1,5	2,1	1,8	14,8	15,0	16,4	15,0
2,3	2,5	2,0	1,5	16,6	18,4	17,4	20,5
3,0	2,1	2,0	1,3	22,8	15,7	16,6	16,2
2,5	2,0	1,8	1,8	16,5	15,5	15,1	19,2
2,8	2,8	2,5	2,0	15,5	16,3	16,0	17,1
3,1	3,0	3,4	2,0	16,8	16,4	16,0	18,4
2,5	2,5	2,1	1,8	16,6	18,3	15,6	15,8
2,5	2,9	2,5	2,4	16,3	22,9	17,2	17,4
2,4	2,1	2,5	2,9	15,9	15,6	16,7	18,8
2,3	2,5	2,4	2,6	13,9	15,4	16,4	15,3
3,0	2,5	2,8	2,5	21,0	17,9	17,8	19,0
2,1	2,6	2,5	2,5	15,7	16,4	16,9	18,6
2,8	2,4	2,5	2,5	17,5	17,4	16,9	17,6
3,3	3,8	2,3	2,3	16,8	17,1	15,9	19,0
2,9	4,8	2,8	2,3	17,5	17,8	16,6	19,5
3,3	4,3	2,8	2,9	14,9	16,6	15,6	19,9
3,0	3,6	2,5	2,4	16,5	16,0	15,5	18,4
2,9	3,3	3,0	2,8	16,4	16,4	17,0	18,6
Mittel:							
2,76	3,08	2,53	2,46	16,6	17,3	16,5	18,3

Ersatzfutterperiode I.

Harnmenge in Liter angegeben				N im Harn, in g			
1	2	3	4	1	2	3	4
2,5	2,7	3,2	2,7	13,5	12,3	16,4	18,6
3,8	4,5	4,0	3,0	18,6	16,0	16,6	17,9
3,8	4,1	3,8	3,8	16,0	16,5	17,5	17,2
3,0	4,0	3,1	2,8	17,0	17,6	16,9	18,5
4,0	3,8	3.3	3,3	15,6	16,1	16,2	18,5
4,0	4,5	3,0	3,0	18,0	16,7	16,4	17,5
3,3	3,8	3,2	2,8	17,6	17,2	16,6	19,7
4,1	3,8	3,0	3,3	17,9	15,8	15,9	19,4
3,8	3,5	3,3	3,3	15,9	17,3	17,1	19,6
2,6	3,3	2,9	2,2	15,7	17,5	16,9	18,9
4,1	3,5	3,2	2,8	19,9	17,9	16,7	20,5
3,4	3,5	2,3	2,7	17,0	16,4	16,2	19,1
4,3	3,5	3,0	3,4	17,0	17,3	16,4	19,0
4,2	4,2	3,4	3,1	17,1	15,9	16,4	20,0
3,9	4,5	3,2	2,8	15,1	16,4	16,2	18,5
3,8	3,9	3,5	4,0	16,3	17.3	16,4	18,2
3,9	3,4	3.3	2,8	18,9	16,5	16,4	18,2
3,9	3,9	3,2	3,2	16,6	16,8	16,8	18,2
4,1	3,4	3,2	3,4	15,5	17,5	17,8	19,5
4,0	4,5	3,8	3,0	17,4	18,2	16,4	17,9
Mittel:							
3,85	3,75	3,21	3,06	16,8	17,0	16,6	18,9

Ersatzfutterperiode II.

Harnmenge in Liter angegeben				N im Harn, in g			
1	2	3	4	1	2	3	4
4,0	4,5	3,8	3,6	17,1	18,0	15,8	15,0
2,9	4,0	3,4	3,8	13,2	13,7	14,8	15,8
3,3	3,0	3,0	2,8	13,2	13,4	14,5	15,0
3,5	3,7	2,8	3,3	13,8	13,4	14,0	15,3
3,9	4,0	3,2	3,1	12,2	14,5	16,5	14,8
3,2	4,2	2,8	2,3	12,8	13,5	14,7	16,1
4,4	3,8	3,7	2,9	13,2	13,3	13,9	14,8
3,9	3,8	3,0	3,3	14,6	13,6	14,6	15,6
4,5	4,0	3,3	3,5	13,9	13,3	13,5	14,5
4,4	4,0	3,2	3,5	13,9	13,2	13,5	14,5
3,2	3,2	3,3	3,6	13,2	13,3	13,2	14,9
2,4	4,9	2,3	2,8	13,2	15,5	13,0	15,6
3,2	6,7	2,8	2,5	12,5	14,9	12,6	14,3
2,0	6,0	3,3	3,2	13,3	14,0	13,7	14,5
3,5	5,2	3,1	2,0	12,6	14,8	14,4	13,3
3,2	5,1	2,7	2,4	13,2	13,1	13,3	16,5
3,0	5,3	2,2	2,4	13,2	13,4	13,4	13,7
3,7	3,1	2,7	2,8	13,5	13,2	15,3	13,7
3,5	5,4	2,7	2,7	14,1	12,7	13,4	14,1
3,9	5,1	2,8	2,7	14,1	12,7	13,4	14,2
Mittel:							
3,30	4,70	2,90	2,90	13,5	13,6	13,6	14,6

Grundfutterperiode II[1]).

Harnmenge in Liter angegeben				N im Harn, in g.			
1	2	3	4	1	2	3	4
6,9	7,6	5,2	5,7	30,2	31,8	29,5	34,0
7,3	7,1	6,6	5,1	34,9	34,1	34,8	33,5
7,3	8,2	5,0	5,1	39,0	34,7	32,6	37,1
6,8	8,1	5,8	5,5	36,4	34,4	32,8	39,4
7,7	9,2	5,5	5,8	38,9	37,5	35,6	39,5
7,6	7,5	5,9	6,5	39,4	33,1	33,4	36,4
8,0	7,6	6,3	5,9	35,5	33,1	29,1	35,6
6,6	6,2	5,9	5,2	34,6	32,5	33,7	36,9
8,8	7,0	5,8	6,2	37,8	34,7	32,7	37,1
8,8	6,5	6,5	6,4	37,3	33,2	32,6	37,2
8,9	7,8	5,9	5,9	37,7	37,2	34,7	37,8
Mittel:							
4,00	3,70	2,90	2,90	18,6	17,2	16,6	18,7

[1]) Siehe Anmerkung am Schluß dieser Tabellen.

Ersatzfutterperiode III.

Harnmenge in Liter angegeben				N im Harn, in g			
1	2	3	4	1	2	3	4
7,8	8,0	7,4	6,3	35,1	30,8	31,0	33,2
9,1	8,8	7,2	8,0	34,0	30,7	30,7	32,3
8,9	7,6	7,2	7,0	31,2	30,2	30,6	33,4
9,6	8,8	7,1	7,2	31,5	31,6	29,7	34,0
9,1	8,6	7,1	8,0	36,0	30,9	27,0	33,9
8,8	8,7	7,4	7,1	34,7	32,0	29,3	32,6
8,8	6,8	5,9	7,1	38,4	31,1	26,8	32,1
8,8	7,8	7,7	7,3	33,7	30,5	27,5	31,0
9,0	7,8	6,8	8,0	31,4	31,0	27,4	31,9
8,7	6,8	6,4	6,3	34,6	28,6	29,5	29,1
Mittel:							
4,40	3,90	3,40	3,70	17,3	15,4	14,8	15,2

Ersatzfutterperiode IV.

Harnmenge in Liter angegeben				N im Harn, in g			
1	2	3	4	1	2	3	4
7,8	7,0	7,8	9,4	26,0	25,4	25,5	24,5
8,5	6,3	5,7	8,8	30,5	30,0	27,0	29,8
8,3	6,8	5,9	4,6	33,8	30,0	26,5	26,6
8,1	5,9	6,0	6,0	34,1	30,0	27,0	32,9
7,9	6,8	6,9	6,7	32,5	30,5	28,1	31,2
9,0	7,1	6,0	7,0	31,0	30,7	27,1	30,6
3,8	3,6	3,3	3,0*)	12,4	15,7	13,9	13,9*)
4,9	4,0	3,5	3,8*)	18,1	15,4	15,0	14,0*)
4,1	3,7	2,5	2,6*)	15,9	18,5	13,0	14,2*)
8,8	7,3	6,7	4,9	35,1	29,4	30,0	30,7
Mittel:							
4,25	3,55	3,19	3,10	16,2	15,5	14,1	15,1

*) Tägliche Analyse.

Grundfutterperiode III.

Harnmenge in Liter angegeben				N im Harn, in g			
1	2	3	4	1	2	3	4
3,9	4,1	2,3	3,1*)	19,9	18,1	16,9	18,0*)
8,6	7,4	6,0	6,8	37,4	39,0	38,0	41,2
8,9	8,3	7,9	5,8	40,8	37,0	37,8	40,0
8,8	7,8	6,6	6,0	40,6	38,0	37,1	39,9
8,7	7,8	6,7	5,9	38,0	38,0	37,1	38,5
7,8	8,1	7,6	6,9	39,7	37,7	37,8	38,8
9,0	8,1	7,1	6,9	40,0	38,0	37,0	37,3
4,9	3,5	4,0	3,9*)	20,2	20,5	18,6	16,8*)
4,6	4,4	3,3	3,1*)	20,0	19,3	18,7	17,0*)
Mittel:							
4,40	3,90	3,60	3,30	19,7	19,2	18,6	18,5

*) Tägliche Analyse.

Von der Grundfutterperiode II an wurde nicht mehr die Harnmenge eines jeden Tages, sondern die Menge von je 2 Tagen untersucht, infolgedessen stets die Summe der Harnausscheidungen zweier aufeinanderfolgender Tage in den Tabellen von dieser Zeit an vermerkt ist.

Gewicht der Ziegen in Kilogrammen.

Grundfutterperiode I.					Ersatzfutterperiode I.				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
37,2	39,0	36,4	33,1	34,5	37,9	38,2	36,0	34,9	35,0
36,9	39,0	36,1	33,0	34,8	38,6	38,2	36,4	35,0	34,9
37,0	38,7	35,7	33,1	33,7	38,6	38,2	36,2	35,0	35,5
37,1	38,7	35,5	33,2	33,7	38,5	38,1	36,1	35,1	34,9
37,2	38,6	35,5	33,3	34,0	38,5	38,2	36,2	35,3	35,0
37,3	38,8	35,5	33,7	34,1	37,5	38,3	36,3	35,4	35,1
37,7	39,0	36,1	34,5	34,5	37,5	38,6	36,6	35,8	35,5
37,8	38,9	36,3	34,3	34,8	37,5	38,3	36,6	35,7	35,3
37,7	38,7	36,6	34,5	34,4	37,3	38,3	36,6	35,7	35,0
37,4	38,8	36,2	34,4	34,2	36,9	38,2	36,6	35,6	35,9
38,0	38,7	36,3	34,8	34,7	37,4	38,4	36,3	35,5	35,7
38,2	38,5	36,3	34,4	34,6	37,6	38,6	36,4	36,0	36,3
38,3	38,7	36,6	34,9	34,6	38,1	38,3	36,7	36,3	36,2
37,9	38,7	36,8	34,9	34,6	38,3	38,7	36,7	36,4	36,6
38,3	38,4	36,1	34,7	34,8	37,8	38,5	36,6	36,0	35,7
38,3	38,0	36,0	34,5	34,8	37,6	38,4	36,6	36,4	36,3
38,3	37,6	36,0	34,3	34,9	37,9	38,6	36,6	36,4	36,4
37,8	37,5	36,0	34,7	35,0	38,4	38,1	36,7	36,5	36,0
38,0	37,6	36,0	34,7	35,0	38,1	38,5	36,6	36,3	36,5
38,0	38,1	36,0	34,7	35,0	38,2	38,4	36,5	36,6	36,2
Mittel:									
38,0	38,3	36,3	34,6	34,6	37,8	38,4	36,6	36,1	36,0

Ersatzfutterperiode II.					Grundfutterperiode II.				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
38,2	38,5	36,6	36,7	36,5	37,8	39,3	37,5	38,4	34,6
38,3	38,8	36,6	37,0	37,1	38,2	39,5	37,5	38,2	35,0
39,1	39,0	37,0	37,3	36,5	37,8	39,6	37,3	37,5	34,9
38,8	39,6	37,2	37,6	36,2	37,3	39,5	37,2	37,4	35,1
38,8	40,2	37,7	38,2	37,6	37,4	39,3	36,8	36,9	34,6
39,1	40,4	37,3	36,6	37,1	37,4	38,8	36,6	37,1	36,0
39,0	41,2	37,2	36,8	37,3	37,9	38,6	36,6	36,6	35,4
38,5	41,3	36,9	38,5	36,6	37,3	38,3	36,7	37,0	36,0
38,3	41,5	36,8	37,5	39,3	37,6	38,0	35,3	36,9	34,6
38,2	41,2	36,8	37,6	37,6	38,1	38,1	36,2	36,4	34,6
38,1	40,7	36,9	37,8	37,3	37,9	38,2	36,2	36,7	34,3
37,6	40,4	36,9	37,8	37,3	37,8	38,6	36,7	36,8	35,1
38,0	40,4	37,3	37,8	35,3	37,7	39,1	37,0	36,8	35,7
38,0	39,0	37,8	37,9	35,1	37,3	38,9	36,8	36,7	35,3
37,7	38,7	37,7	38,1	35,8	37,8	39,1	37,0	37,1	36,7
37,9	38,8	37,6	38,5	35,3	37,5	38,9	37,4	36,9	35,8
38,4	39,0	37,5	38,6	35,2	37,9	39,4	36,9	37,4	36,0
38,4	38,8	37,6	38,5	34,5	37,9	39,4	36,8	37,4	35,8
38,3	39,2	37,6	38,0	34,7	37,7	39,1	37,1	37,5	35,6
38,3	39,4	37,9	38,8	34,7	37,6	39,1	37,1	37,7	35,9
—	—	—	—	—	37,6	39,9	37,4	38,3	37,4
—	—	—	—	—	37,5	40,0	37,3	38,2	37,4
Mittel:									
38,1	39,9	37,3	38,1	—	37,7	38,9	36,8	37,2	35,8

Ersatzfutterperiode III.					Ersatzfutterperiode IV.				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
38,2	40,3	37,7	38,4	37,7	39,1	39,8	38,5	39,7	36,1
38,7	39,9	37,4	38,5	36,9	38,7	40,6	38,4	38,9	35,4
39,0	40,0	37,5	38,7	37,1	40,4	40,4	37,8	37,7	37,1
38,5	39,6	37,3	38,8	36,9	41,6	41,3	38,4	40,0	38,1
38,9	39,9	36,5	38,3	36,2	41,3	42,0	38,8	39,1	36,0
38,9	40,1	37,0	38,8	36,2	41,2	41,5	39.3	39,4	36,2
38,5	40,3	36,6	38,8	37,3	40,9	41,2	39,0	40,5	36,4
38,7	40,3	37,1	38,9	37,3	41,1	41,3	39,1	40,6	37,0
38,9	40,4	37,3	39,0	35,5	41,0	41,1	38,8	40,5	36,5
38,5	40,4	37,3	38,5	35,6	41,4	41,3	38,8	40,5	36,9
38,5	40,0	37,5	38,7	36,4	41,5	41,2	38.8	41,3	36,3
38,2	39,5	37,0	39,9	35,3	42,2	41,2	38,7	40,0	37,3
38,2	40.0	37,6	39,3	36,1	41,8	41.2	39,3	40,0	37,6
38,5	39,7	37,8	39,3	36,5	42,2	41,2	39,3	40,4	37,2
38,5	39,8	38,1	39,9	37,3	42,2	41,2	39,5	40,6	37,6
39,0	39,6	38,0	39,6	36,0	41,5	41,2	40,0	40,5	37,9
39,0	39,5	38,2	39,7	36,2	41,9	41,2	40,0	40,8	37,7
39,0	39,5	38,5	40,3	35,7	—	—	—	—	—
39,0	39,5	38,1	39,4	35,4	—	—	—	—	—
39,1	40,0	37,9	40,4	36,4	—	—	—	—	—
Mittel:									
38,7	39,9	37,7	39,4	36,1	41,7	41,2	39,2	40,5	37,2

Grundfutterperiode III.				
1	2	3	4	5
41,9	41,1	40,3	41,4	38,1
41,8	41,3	40,3	40,7	38,5
41,1	40,6	40,1	39,4	38,1
41,0	40,5	39,7	39,2	37,4
40,9	40,1	39,1	39,1	36,7
40,7	39,9	38,6	38,5	36,2
40,7	39,6	38,4	38.9	36,1
40,7	40,0	38,6	39,3	36.0
40.8	39,8	38,0	38,9	36,5
40,8	39,8	38.1	39,1	36,0
41,1	39,9	38,3	38,9	36,5
41,6	39,7	38.3	39,3	36,7
41,4	40,2	38,4	39,5	36,7
41,4	40,4	38,6	39,6	37.0
41,6	40,5	38,6	39,4	37,1
41.5	40,5	38,6	39,5	37,0
Mittel:				
41,2	40,1	38,4	39,3	36,6

Jodidbestimmung im Harn.

Von

Richard v. Bodó.

(Aus dem pharmakologischen Institut der k. ungar. Elisabeth-Universität Pécs.)

(Eingegangen am 21. Mai 1925.)

Mit Untersuchungen über das Schicksal des Jods im tierischen Organismus beschäftigt, ergab sich die Notwendigkeit eines Verfahrens, welches in Organen und Säften die genaue Bestimmung kleiner Mengen Jods gestattet, und zwar nicht, wie es immer geschieht, nach Veraschung der organischen Substanzen, wodurch das gesamte Jod in ionisiertes Jod übergeführt wird, sondern eines Verfahrens, welches geeignet ist, außer der gesamten Jodmenge auch jenes zu bestimmen, welches präformiert als ionisiertes Jod vorhanden ist. Zu diesem Zwecke ist nur die von *Lassaigne-Hilger*[1]) stammende gravimetrische Bestimmung bekannt, welche das Jod als PdJ_2 zur Wägung bringt, welche schon durch ihre Kostspieligkeit unzweckmäßig erscheint.

Bei der Ausarbeitung einer derartigen Methode beschränkten wir uns zunächst auf die Bestimmung ionisierten Jods im Harn. Das Verfahren, welches im folgenden beschrieben werden soll, erwies sich als gut brauchbar für die Bestimmung selbst kleinster Jodmengen.

Das Prinzip der Methode ist folgendes:

Der durch HNO_3 angesäuerte Harn wird mit einem Überschuß von $AgNO_3$ versetzt, der entstandene Niederschlag von $AgCl$ und von AgJ quantitativ gesammelt, in Wasser suspendiert und nach Ansäuerung durch HCl mit Chlorwasser behandelt, wobei das $AgCl$ unverändert bleibt, das AgJ in $AgCl$ übergeht und das frei gewordene J_2 zu HJO_3 oxydiert wird, wodurch die sechsfache Menge des ursprünglich vorhandenen Jods zur Bestimmung gelangt, was jedenfalls als großer Vorteil zu verzeichnen ist. Das überflüssige Chlor wird nun durch Erhitzen entfernt, die Lösung abgekühlt und mit H_3PO_4 reichlich angesäuert, danach filtriert, wobei das $AgCl$ am Filter zurückbleibt,

---

[1]) *Hilger*, Liebigs Ann. **171**, 212.

das HJO_3 dagegen in das Filtrat übergeht und dort nach Zugabe von KJ und Stärke auf gewohnte Art durch $Na_2S_2O_3$ bestimmt wird.

Sollten im Harn auch Bromsalze anwesend sein, so stören dieselben den Gang der Bestimmung nicht im geringsten, da das durch das Chlor frei gewordene Brom beim Erhitzen mit dem Chlor verjagt wird.

Zur Begründung der Einzelheiten der Methode sei kurz folgendes mitgeteilt:

Die Fällung des nativen Harns mit $AgNO_3$ ermöglicht sofort eine Trennung der präformierten Jodide von Harnbestandteilen, welche durch die Behandlung mit Chlor zerstört würden, wodurch auch das organisch gebundene Jod zum Teil zur Bestimmung käme.

Es muß darauf geachtet werden, daß der so erhaltene Silberniederschlag auch keine Spuren von $AgNO_3$ enthält, da, wie bekannt, das Chlorwasser aus $AgNO_3$ neben AgCl und AgOCl auch $AgClO_3$ bildet, welches im weiteren Gange der Bestimmung durch die H_3PO_4 in $HClO_3$ übergeht, letztere aber macht aus dem Kaliumjodid Jod frei und verbraucht dadurch bei der Titration $Na_2S_2O_3$. Um diesen Fehler zu vermeiden, wird der gesammelte Niederschlag von AgCl und AgJ mit so viel HCl versetzt, als zur Überführung des dem Niederschlag anhaftenden $AgNO_3$ in AgCl unbedingt genügt.

Das Chlorwasser muß in großem Überschuß vorhanden sein, denn die Überführung von AgJ in AgCl beansprucht weit mehr Chlorwasser, als für die Überführung von HJ in HJO_3 notwendig ist.

Der Überschuß von Chlor wird durch Erhitzen entfernt, was durch Zugabe von Methylorange oder Methylrot kontrolliert wird (*L Winkler*), welche schon durch Spuren von Chlor entfärbt werden. Falls während des langsamen Abkühlens der Indikator sich entfärben sollte, fügen wir noch einige Tropfen der kalten Lösung hinzu, und wenn diese dauernd ihre Farbe behält, sind wir gesichert, daß alles Chlor entwichen ist.

Zur Ansäuerung wird verdünnte 10proz. H_2SO_4 oder noch besser 20proz. H_3PO_4 im Überschuß verwendet. Die H_3PO_4 darf keine Spuren von H_3PO_3 enthalten, weil diese das JO_3' reduziert. Zur Prüfung wird die H_3PO_4 zum Sieden erhitzt und mit $KMnO_4$ versetzt. Reine Phosphorsäure wird schon bei Zugabe von 1 Tropfen einer 1proz. $KMnO_4$-Lösung dauernd rosa gefärbt.

Im einzelnen wird folgendermaßen vorgegangen:

Zur Bestimmung soll nur klarer Harn angewandt werden. Ist derselbe trübe, was besonders beim Hundeharn häufig der Fall ist, so muß er zuerst geklärt werden, was durch wiederholtes Filtrieren und eventuellem Zentrifugieren leicht zu erreichen ist. Zuweilen kommt es bei Verwendung von Hundeharn vor, daß auch bei Abwesenheit von Jod 0,1 bis 0,4 ccm n/100 $Na_2S_2O_3$ verbraucht werden. Dieser

Fehler kann durch Hinzufügen von 1,0 g Carbamid zum nativen Harn vermieden werden. Bei der Bestimmung geringer Jodmengen wird die zu verwendende Menge $AgNO_3$ von den Chloriden des Harns bestimmt. Zu 25 ccm Harn genügen zumeist 50 bis 60 ccm n/10 $AgNO_3$. Nach genauer Abmessung des Harns (25 ccm) aus einer Bürette wird in einem Kolben von etwa 300 ccm n/10 $AgNO_3$ (50 bis 60 ccm) hinzugefügt, mit n HNO_3 (5 ccm) angesäuert und 12 bis 24 Stunden in der Dunkelheit stehengelassen. Die Lösung wird durch ein aschefreies Filter gegossen, wobei möglichst vermieden werden soll, daß viel Niederschlag auf das Filter gelangt, das Filter noch feucht zum Niederschlag in den Kolben gebracht und mit Wasser (100 ccm) aufgeschwemmt. Nach Hinzufügen von etwa 1 ccm n HCl und Bimssteinkörnchen versetzen wir mit etwa 15 ccm frisch bereiteten gesättigten Chlorwassers. Nun wird auf freier Flamme gekocht, bis das Chlor entwichen ist; dann wird abermals mit Chlorwasser versetzt (15 ccm) und wieder gekocht; schließlich überzeugen wir uns durch Hinzufügen von einigen Tropfen Methylorange, daß alles Chlor verjagt ist. Nach Abkühlen der Lösung wird filtriert, das Filtrat mit 20proz. reinster H_3PO_4 angesäuert (20 ccm), mit 20 Tropfen einer 10proz. KJ-Lösung versetzt und nach Hinzufügen von 1 bis 2 ccm 1proz. Stärkelösung nach 10 Minuten mit n/10 bis n/100 $Na_2S_2O_3$ titriert. Bei beendigter Titration schlägt die blaue Farbe in Rot um (Methylorange!).

Die Brauchbarkeit der Methode ergab sich durch folgende Bestimmungen, wobei wir genau bekannte KJ-Mengen einerseits zum Harn, andererseits zu destilliertem Wasser zufügten. Im Wasser geschah die Bestimmung nach der Methode von *L. Winkler*[1]), im Harn nach der eben beschriebenen.

Die Ergebnisse sind aus folgender Tabelle ersichtlich:

Zugefügt Jod	A. Destilliertes Wasser + KJ Bestimmung nach *L. Winkler*		Gefunden Jod	B. Menschlicher Harn + KJ Bestimm. nach eigener Methode		Gefunden Jod
	Verbraucht n/10 $Na_2S_2O_3$-Lösung	Gefunden 6fache Menge Jod (als HJO_3)		Verbraucht n/10 $Na_2S_2O_3$-Lösung	Gefunden 6fache Menge Jod (als HJO_3)	
g	ccm	g	g	ccm	g	g
	12,02	0,152 56		12,00	0,152 33	
0,0255	12,03	0,152 69	$0{,}0254_5$	12,04	0,152 82	$0{,}0254_3$
	12,04	0,152 82		12,02	0,152 56	
	6,02	0,076 41		6,00	0,076 15	
0,0127	6,01	0,076 28	$0{,}0127_4$	6,01	0,076 28	$0{,}0127_1$
	6,02	0,076 41		6,02	0,076 41	
	3,01	0,038 20		3,00	0,038 08	
0,0064	3,03	0,038 46	$0{,}0063_9$	3,04	0,038 58	$0{,}0063_9$
	3,02	0,038 33		3,02	0,038 33	

[1]) *L. Winkler*, Pharmazeutische Zentralhalle **63**, 384.

Zugefügt Jod	A. Destilliertes Wasser + KJ Bestimmung nach *L. Winkler*		Gefunden Jod	B. Menschlicher Harn + KJ Bestimm. nach eigener Methode		Gefunden Jod
	Verbraucht n/100 $Na_2S_2O_3$-Lösung	Gefunden 6fache Menge Jod (als HJO_3)		Verbraucht n/100 $Na_2S_2O_3$-Lösung	Gefunden 6fache Menge Jod (als HJO_3)	
g	ccm	g	g	ccm	g	g
	12,00	0,015 23		11,96	0,015 18	
0,0025	12,00	0,015 23	$0,0025_4$	12,00	0,015 23	$0,0025_4$
	12,01	0,015 24		11,98	0,015 21	
	6,00	0,007 62		5,96	0,007 57	
0,0013	5,98	0,007 59	$0,0012_7$	5,98	0,007 60	$0,0012_6$
	5,99	0,007 60		5,95	0,007 55	
	2,99	0,003 80		2,96	0,003 76	
0,0007	3,01	0,003 82	$0,0006_4$	3,00	0,003 81	$0,0006_3$
	3,00	0,003 81		2,98	0,003 78	
	Verbraucht 0,005n $Na_2S_2O_3$-Lösung			Verbraucht 0,005n $Na_2S_2O_3$-Lösung		
	2,98	0,001 89		2,95	0,001 87	
$0,0003_5$	3,01	0,001 91	$0,0003_2$	2,96	0,001 88	$0,0003_1$
	3,00	0,001 90		2,99	0,001 89	

Beitrag zur Oxydation der Oxalsäure durch Kaliumpermanganat.

Von

Georg Scheff.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der k. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 23. Mai 1925.)

In weiterer Verfolgung des in der Mitteilung von *Helene Gombos*[1]) aufgeworfenen Gedankens, daß „es wohl möglich wäre, der quantitativen Bestimmung geringster Mengen solcher organischer Substanzen, die durch Kaliumpermanganat oxydabel sind, abweichend von dem bisher üblichen Titrationsverfahren die Änderung zugrunde zu legen, die die Lichtabsorption einer Permanganatlösung anläßlich ihrer Reduktion erfährt", habe ich eine Reihe von Versuchen ausgeführt, durch die die obige Frage zwar zunächst noch nicht endgültig beantwortet ist; doch geht aus ihnen einerseits hervor, daß die Reduktion des Permanganats durch Oxalsäure auch mittels der Spektrophotometrie quantitativ verfolgt werden kann, andererseits, daß die Reaktion, wenn sie unter anderen Bedingungen als üblich ausgeführt wird, abweichende, jedoch konstante quantitative Zusammenhänge erkennen läßt.

Der für so manche biochemische Untersuchungen so wichtige Vorgang der Reduktion des Kaliumpermanganats durch Oxalsäure ist von sehr komplexer Natur, und es gibt eine Anzahl von Arbeiten, in denen versucht wurde, diesen Vorgängen näher zu treten. Bei höheren Temperaturen verläuft der Prozeß sehr rasch und ist einer näheren Analyse kaum zugänglich; daher erschien es vielen Autoren zweckdienlich, die Reaktion bei niederen Temperaturen, also weit langsamer verlaufen zu lassen; auf diese Weise konnte die Abhängigkeit des Prozesses von verschiedenen Faktoren besser beobachtet werden. Die Mehrzahl dieser Arbeiten hat das Studium der Kinetik des Prozesses zum Vorwurf. Da ich von anderen Gesichtspunkten geleitet wurde,

[1]) *Helene Gombos*, diese Zeitschr. **151**, 1, 1924.

unterscheiden sich meine nachstehend mitgeteilten Versuche in mehreren Beziehungen von jenen:

1. Sie wurden bei 70° C, also bei der Temperatur ausgeführt, die für die allbekannte Titration der Oxalsäure mit Permanganat vorgeschrieben ist.

2. Es wurde nicht freie Oxalsäure, sondern das beim Einstellen von Permanganatlösungen bevorzugte Natriumsalz verwendet.

3. Die Konzentration des Oxalats war weit geringer, als dem Verhältnis 5 Mol Oxalsäure auf 2 Mol Permanganat entspricht; Permanganat war also stets in großem Überschuß vorhanden.

4. Die Reaktionsdauer betrug in der überwiegend größten Zahl der Versuche 30 Minuten; nur einigemal 1½ bzw. 3 bzw. 5 und 10 Stunden.

5. Die Konzentration des unreduziert gebliebenen Anteils des Permanganats wurde in allen Versuchen spektrophotometrisch, in der Mehrzahl der Versuche außerdem auch durch Titration festgestellt.

Beschreibung der Versuche.

In zwei je 50 ccm fassenden Meßkolben, C und D, wurden genau abgemessene Volumina folgender Lösungen vermischt: eine Lösung von oxalsaurem Natrium, eine Lösung von Kaliumpermanganat, 33 proz. Schwefelsäure und destilliertes Wasser bis zur Marke. Die respektiven Volumina waren so bemessen, daß in einer Versuchsgruppe abgerundet 10 bis 50 mg oxalsaures Natrium bzw. 63,5 bis 67,0 mg Kaliumpermanganat, in einer anderen Versuchsgruppe 0,7 bis 5,3 mg oxalsaures Natrium bzw. 5,8 bis 6,4 mg Kaliumpermanganat im Gemisch enthalten waren. Von der Schwefelsäure wurden stets 5 ccm verwendet. In Meßkolben A und B, die zu Zwecken eines Leerversuchs aufgestellt wurden, war das oxalsaure Natrium weggelassen. Die so beschickten Meßkolben wurden mit den dazu gehörenden eingeschliffenen Glasstopfen verschlossen, in ein bei 70° C gehaltenes Wasserbad versenkt, genau 30 Minuten darin gelassen, nach Ablauf dieser Zeit herausgenommen und unter dem Leitungswasserstrahl gekühlt. Nun wurde über Nacht an einem kühlen Orte stehengelassen und die Analyse am nächsten Tage, also etwa 18 bis 22 Stunden nach Herstellung des Gemisches, begonnen. Die Flüssigkeit in den Meßkolben, die sich bereits während des Erwärmens im Wasserbade infolge der Ausscheidung von Mangandioxyd (oder eines anderen Manganoxyds ?) getrübt hatte, konnte in diesem Zustande weder titriert, noch aber spektrophotometrisch untersucht werden; wohl aber nach dem Zentrifugieren. Die klar abgegossene Flüssigkeit, die stets von unreduziertem Permanganat gefärbt war, wurde spektrophotometrisch geprüft, und

zwar je nach Intensität ihrer Färbung ohne weiteres, oder aber nach entsprechender Verdünnung.

Zur Ausführung der spektrophotometrischen Ablesungen hatte ich die Wahl unter den fünf Spektralstellen, an denen das Absorptionsverhältnis (*Vierordt*) des Kaliumpermanganats von *Helene Gombos*[1]) mit hinreichender Genauigkeit festgestellt war. Von diesen wählte ich die Spektralstelle 565,0 $\mu\mu$, und zwar aus dem Grunde, weil, wie *Gombos* anführt, „sich hier die Lichtabsorption längs einer größeren Strecke kaum verändert, daher die kaum zu vermeidenden, wenn auch geringen Fehler beim Einstellen des Spektrophotometers auf eine bestimmte Spektralstelle kaum ins Gewicht fallen". Das Absorptionsverhältnis ist an der genannten Stelle gleich 0,000121.

Die Bestimmungen wurden teils mittels eines alten *König*schen Spektrophotometers, teils mittels eines nach *Martens* und *Grünbaum* modifizierten *König*schen Spektrophotometers (große Beleuchtungsvorrichtung) ausgeführt, welch beide Apparate seinerzeit von *P. Hári*[2]) justiert und kalibriert wurden. Als Lichtquelle habe ich an beiden Apparaten Gasglühlicht verwendet.

In der Mehrzahl der Versuche wurde, um die Menge des unreduzierten Permanganats auch auf einem anderen Wege festzustellen, die klar abgegossene gefärbte Flüssigkeit in eine Bürette eingefüllt und eine genau bekannte Menge gelöster Oxalsäure mit ihr in der vorgeschriebenen Weise titriert.

Die Menge des vom Oxalat reduzierten Permanganats ergibt sich aus dem Unterschied zwischen Permanganatgehalt des Gemisches vor und nach dem Erwärmen; jedoch nur in dem Falle, wenn die mit Schwefelsäure versetzte Permanganatlösung allein, während desselben Zeitraums erwärmt, keine merkliche Reduktion erfährt. Da dies nicht von vornherein als ausgemacht angenommen werden durfte, mußten gleichzeitig mit jedem Oxalat-Permanganatversuch die parallelen Leerversuche A und B (ohne Oxalat) aufgestellt werden; denn werden auch in Abwesenheit von Oxalsäure merkliche Mengen von Permanganat reduziert, so darf keineswegs das ursprünglich im Gemisch vorhandene Permanganat als Ausgangspunkt der Berechnung genommen werden, sondern dessen im Leerversuch unreduziert gebliebene Menge.

Tatsächlich erfolgte zwar, wie den Daten der Tabelle I zu entnehmen ist, in den Leerversuchen infolge des Erwärmens keine merkliche Verringerung im Permanganatgehalt, indem durch Titration etwas weniger, durch Spektrophotometrie etwas mehr, also im Mittelwert annähernd so viel gefunden wurde, als ursprünglich vorhanden war.

---

[1]) l. c., S. 6.

[2]) *Paul Hári*, diese Zeitschr. **82**, 229, 1917; **95**, 266, 1919.

Trotzdem habe ich aus prinzipiellen Gründen und weil in einer Reihe von Versuchen der ursprüngliche Permanganatgehalt überhaupt nicht genau festgestellt war, die Menge des durch das Oxalat reduzierten Permanganats stets aus dem Unterschied zwischen Leerversuch und Hauptversuch berechnet. Gang und Berechnung eines solchen Versuchs sollen an der Hand des nachfolgenden, in extenso mitgeteilten Beispiels (Versuch 3) gezeigt werden. Es wurden vermischt:

In Meßkolben A und B:

13 ccm einer 0,515proz. $KMnO_4$-Lösung, enthaltend 67,0 mg $KMnO_4$,
5 ccm 33proz. Schwefelsäure.

In Meßkolben C und D:

8 ccm einer 0,249proz. Lösung von $Na_2(COO)_2$, enthaltend 19,9 mg $Na_2(COO)_2$,
13 ccm obiger $KMnO_4$-Lösung, enthaltend 67,0 mg $KMnO_4$,
5 ccm obiger Schwefelsäure.

Auffüllen aller vier Meßkolben auf 50 ccm, erwärmen im Wasserbade von 70° C durch 30 Minuten, abkühlen, stehenlassen über Nacht, zentrifugieren am nächsten Vormittag, Analyse.

Leerversuche A und B.

a) Spektrophotometrie.

Meßkolben A. In der auf das Zehnfache verdünnten Flüssigkeit betrug der Extinktionskoeffizient 1,130. Auf Grund der Gleichung $c = \varepsilon \,.\, A$ ist c (d. i. die in 1 ccm der Lösung enthaltene Substanz in Grammen ausgedrückt) gleich $1{,}130 \times 0{,}000\,121 = 0{,}000\,137$ g, in den 50 ccm der unverdünnten Lösung sind somit enthalten $0{,}000\,137 \times 10 \times 50 = 0{,}0685$ g. Das ist die Menge des unreduziert gebliebenen Permanganats.

Meßkolben B. Verdünnung auf das Zehnfache. Extinktionskoeffizient 1,126, daher in 1 ccm der verdünnten Lösung $1{,}126 \times 0{,}000\,121 = 0{,}000\,136$ g, in 50 ccm der unverdünnten Lösung $0{,}000\,136 \times 10 \times 50 = 0{,}0680$ g unreduziertes Permanganat verblieben waren.

Im Mittelwert der beiden Versuche A und B waren also am Ende des Versuchs **0,0682 g** Kaliumpermanganat vorhanden.

b) Titration.

Meßkolben A. Von der in die Bürette eingegossenen unverdünnten Flüssigkeit waren zur Oxydation von 0,0221 g Oxalsäure 11,55 ccm erforderlich, es waren also in den ganzen 50 ccm $\frac{50 \,.\, 0{,}221 \,.\, 31{,}6}{11{,}55 \,.\, 45} = 0{,}0669$ g unreduziertes Permanganat vorhanden.

Meßkolben B. Zur Oxydation von 0,0221 g Oxalsäure waren 11,65 ccm der unverdünnten Flüssigkeit erforderlich, daher waren in den ganzen 50 ccm $\frac{50 \,.\, 0{,}221 \,.\, 3{,}16}{11{,}65 \,.\, 45} = 0{,}0663$ g unreduziertes Permanganat enthalten.

Im Mittelwert der Versuche C und D waren also in 50 ccm der Lösung **0,0666 g** unreduziertes Permanganat enthalten.

Hauptversuche C und D.

a) Spektrophotometrie.

Meßkolben C. Die vom Niederschlag abgehobene klare Flüssigkeit wurde auf das Zehnfache verdünnt und spektrophotometrisch bestimmt. Extinktionskoeffizient = 0,855, hieraus in 1 ccm der verdünnten Lösung enthalten 0,885 . 0,000121 = 0,000103 g; in 50 ccm der unverdünnten Lösung sind 0,000103 . 10 . 50 = 0,0515 g unreduziertes Permanganat verblieben.

Meßkolben D. Verdünnung auf das Zehnfache; Extinktionskoeffizient = 0,862; c = 0,867 . 0,000121 = 0,000104 g; in 50 ccm der unverdünnten Lösung 0,000104 . 10 . 50 = 0,0520 g unreduziert gebliebenes Permanganat.

Im Mittelwert der beiden Versuche C und D blieben durch Spektrophotometrie bestimmt **0,0518 g** Kaliumpermanganat unreduziert.

b) Titration.

Meßkolben C. Von der in die Bürette eingefüllten unverdünnten Flüssigkeit waren 12,35 ccm erforderlich, um 0,0176 g Oxalsäure zu oxydieren, also waren in den ganzen 50 ccm enthalten $\frac{50 \,.\, 0{,}0176 \,.\, 31{,}6}{12{,}35 \,.\, 45}$ = 0,0499 g Permanganat verblieben.

Meßkolben D. Zur Oxydation von 0,0132 g Oxalsäure waren 9,30 ccm unverdünnte Flüssigkeit erforderlich, daher waren in den ganzen 50 ccm $\frac{50 \,.\, 0{,}0132 \,.\, 31{,}6}{9{,}30 \,.\, 45}$ = 0,0498 g unreduziertes Permanganat enthalten.

Als Mittelwert der Versuche C und D ergab sich somit **0,0499 g** unreduziertes Permanganat.

Endergebnis.

Für das durch das Oxalat reduzierte Permanganat ergab sich in diesen Versuchen:

durch *Spektrophototometrie* ermittelt: 0,0682 – 0,0518 = **0,0164 g.**
durch *Titration* ermittelt: 0,0666 – 0,0499 = **0,0167 g.**

Die Ergebnisse meiner Versuche Nr. 1 bis 10 sind in Tabelle I zusammengestellt, und es geht aus ihnen folgendes hervor:

Unter den obwaltenden Versuchsbedingungen, wie

a) großer Überschuß an Permanganat,
b) Versuchstemperatur 70° C,
c) Versuchsdauer 30 Minuten,

wurde durch das Oxalat ausnahmslos in allen Versuchen weit mehr Permanganat reduziert, als dem Verhältnis: 2 Mol Permanganat auf 5 Mol Oxalsäure entsprechen würde. Suchen wir zu berechnen, in welcher Beziehung dieses Plus zu der Menge des in den Versuchen verwendeten Oxalats steht, so ergibt sich, daß es gleichgültig ist, ob 9,95 mg Oxalat (Versuch 1) oder aber 49,8 mg Oxalat auf 67 mg Permanganat eingewirkt hatten: *die Zahl, durch die als durch einen Faktor ausgedrückt wird, um wie vieles mehr vom Permanganat durch das Oxalat reduziert wird,* als der Gleichung entspricht, *schwankt* mit Ausnahme

Tabelle I.

Nr.	Im Gemisch ursprünglich enthalten		Unreduziertes Permanganat im Leerversuch, ermittelt durch		Unreduziertes Permanganat im Hauptversuch, ermittelt durch		Reduziertes Permanganat (Leerversuch—Hauptversuch) ermittelt durch		Reduziertes Permanganat: Mittelwert aus Spektrophotometrie u. Titration	Dem Oxalat würde entsprechen an reduziertem Permanganat, berechnet aus dem Verhältnis 2 Mol Permanganat auf 5 Mol Oxalat	Reduziertes Permanganat gef. / Reduz. Permanganat ber.
	Oxalat	Permanganat	Spektrophotometrie	Titration	Spektrophotometrie	Titration	Spektrophotometrie	Titration			
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	
1	9,95	67,0	68,4	66,6	60,1	57,5	8,3	9,1	8,7	4,69	1,86
2	12,4	67,0	69,3	66,6	57,7	57,1	11,6	9,5	10,6	5,84	1,81
3	19,9	67,0	68,2	66,6	51,8	49,9	16,4	16,7	16,5	9,38	1,76
4	21,5	67,0	69,2	66,4	50,3	48,9	18,9	17,5	18,2	10,1	1,80
5	24,8	67,0	69,3	66,6	48,9	46,5	20,4	20,1	20,3	11,7	1,74
6	29,9	67,0	68,4	66,6	43,3	41,4	25,1	25,2	25,2	14,1	1,79
7	30,1	63,5	64,6	62,6	39,3	37,0	25,3	25,6	25,5	14,2	1,80
8	32,2	67,0	69,2	66,4	40,7	40,2	28,5	26,2	27,4	15,2	1,80
9	39,8	67,0	68,4	66,6	33,3	33,3	35,1	33,3	34,2	18,8	1,82
10	49,8	67,0	68,4	66,6	24,1	24,8	44,3	41,8	43,1	23,5	1,83
11	0,76	6,35	6,46	—	5,81	—	0,65	—	0,65	0,36	1,81
12	1,04	—	6,93	—	6,07	—	0,86	—	0,86	0,49	1,76
13	1,75	5,86	6,12	5,53	4,76	4,15	1,36	1,38	1,37	0,82	1,67
14	2,08	—	6,93	—	5,28	—	1,65	—	1,65	0,98	1,68
15	2,61	—	7,81	—	5,61	—	2,20	—	2,20	1,23	1,79
16	3,13	—	7,84	—	5,29	—	2,55	—	2,55	1,47	1,73
17	3,50	5,86	6,12	5,53	3,17	2,77	2,95	2,76	2,86	1,65	1,73
18	5,30	—	7,38	—	3,23	—	4,15	—	4,15	2,50	1,66

einiger Versuche, in denen diese Werte stärker aus der Reihe der übrigen springen, *stets um 1,80 herum.*

Dieses Ergebnis kann kein zufälliges sein! Welche Vorgänge sich dabei abspielen mögen, soll an dieser Stelle nicht zur Erörterung kommen. Sicherlich kommt die Hauptrolle dem Manganosulfat zu, das beim Aufeinanderwirken von Oxalsäure und Permanganat laut der Gleichung

$$2\,KMnO_4 + 3\,K_2SO_4 + 5\,(COOH)_2 = K_2SO_4 + 2\,MnSO_4 + 10\,CO_2 + 8\,H_2O$$

gleich von vornherein entsteht und laut der Gleichung

$$2\,KMnO_4 + 3\,MnSO_4 + 2\,H_2O = K_2SO_4 + 2\,H_2SO_4 + 5\,MnO_2$$

zu einer weiteren fortlaufenden Zersetzung von Permanganat führt.

Das, worauf es mir hier ankommt, ist bloß die Tatsache, daß *der Prozeß durchaus quantitativ verläuft*, obzwar er, wie gleich gezeigt werden soll, bei der von mir in obigen Versuchen verwendeten Versuchsdauer von 30 Minuten nicht abgeschlossen ist.

Gerade weil ich das eingangs erwähnte Problem — die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung permanganatoxydabler Substanzen auf dem Wege der Spektrophotometrie — stets vor Augen hatte (obzwar es durch die hier mitgeteilten Versuche gleichsam auf ein Nebengeleise verschoben erscheint), war es für mich von Interesse zu erfahren, ob die beschriebene Mehrreduktion des Permanganats durch Oxalsäure auch dann in demselben Ausmaß erfolgt, wenn beide Reagenzien nicht in den oben angewendeten, sondern in weit geringeren Konzentrationen aufeinander einwirken. Das war nun, wie aus den in Tabelle I angeführten Ergebnissen der Versuche 11 bis 18 hervorgeht, in der Tat der Fall. Allerdings sind die Resultate hier weniger sicher als in den früher beschriebenen, was höchst wahrscheinlich von technischen Fehlern in der Ausführung der Versuche herrührt; hierauf weist schon der Umstand hin, daß die spektrophotometrisch festgestellten Werte mit den durch Titration erhaltenen, soweit die Kontrolle durch Titration überhaupt ausgeführt wurde, durchaus nicht so gut übereinstimmen.

Daß es sich aber auch hier um denselben Prozeß handelt, geht daraus hervor, daß die erwähnte Verhältniszahl $\left(\frac{\text{gefundene}}{\text{berechnete}}\right.$ Menge an reduziertem Permanganat) in den Versuchen 1 bis 10, wie erwähnt, 1,80, in den Versuchen 11 bis 18 aber angenähert dasselbe, 1,73, betrug. Nach allem dem führt also der Prozeß nach 30 Minuten stets zu demselben Ergebnis; doch wird dabei, wie bereits oben flüchtig erwähnt, kein Definitivum, d. h. kein Maximalwert an reduziertem Permanganat erreicht.

In nachstehender Tabelle II sind die Ergebnisse der wenigen Versuche zusammengestellt, in denen die Reaktionsdauer mehr als 30 Minuten, und zwar bis 10 Stunden betrug.

Tabelle II.

Nr.	Oxalat verwendet mg	Reduziertes Permanganat in mg nach				
		30 Min.	$1^1/_2$ Std.	3 Std.	5 Std.	10 Std.
15	2,61	2,20	2,56	—	—	—
16	3,13	2,55	2,80	3,03	—	—
18	5,30	4,07	4,62	4,94	—	—
7	30,1	25,30	—	—	33,3	49,6

Die Ergebnisse der oben mitgeteilten Versuche lassen sich wie folgt zusammenfassen. *Läßt man Natriumoxalat in Gegenwart von Schwefelsäure auf Kaliumpermanganat, wenn letzteres im Überschuß vorhanden ist, in der Wärme (70° C) längere Zeit hindurch einwirken, so wird durch das Oxalat weit mehr Permanganat reduziert, als dem Verhältnis: 2 Mol Permanganat auf 5 Mol Oxalsäure entspricht. Dabei ist, wenn stets dieselbe Versuchsdauer gewählt wird, die Menge des reduzierten Permanganats proportional der Menge des verwendeten Oxalats.* Wird die Reaktionsdauer verlängert, so wird durch dieselbe Oxalatmenge um so mehr Permanganat reduziert, je länger die beiden Reagenzien aufeinander eingewirkt hatten.

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Prof. *P. Hári* ausgeführt.

Über das Verhalten von Saponinen bei der Dialyse.

Von

L. Kofler und A. Wolkenberg.

(Aus dem pharmakognostischen Institut der Universität Wien.)

(Eingegangen am 25. Mai 1925.)

Die Saponine werden im allgemeinen als nicht oder schwer dialysabel bezeichnet. Bei den in der Literatur als schwer dialysabel angeführten Saponinen liegen meistens keine genaueren Angaben vor, so daß ein Vergleich nicht möglich ist.

Im folgenden stellten wir quantitativ vergleichende Versuche über die Dialysierbarkeit verschiedener Saponine an. Eine weitere Versuchsreihe beschäftigt sich mit der Reinigung von Saponinen durch Elektrodialyse und der Anwendung dieses Verfahrens für den Nachweis kleiner Saponinmengen.

Für diese Versuche verwendeten wir folgende Saponine: Digitonin, Roßkastaniensaponin, Sapotoxin, Senegin, Saponin. pur. albiss. der Firma *E. Merck*, Saponin Sthamer, ein englisches, als Powdered-Saponin bezeichnetes Handelsprodukt, Saponin aus Gypsophila paniculata [*Kofler* und *Dafert* (1)] und kristallisierte Primulasäure [*Kofler* (2)], welche als Natriumsalz in Lösung gebracht wurde.

Versuche mit Dialysierhülsen.

Wir verwendeten Pergamenthülsen von *Schleicher* und *Schüll*, die wir vor und nach den Versuchen mit Nachtblaulösung auf ihre Dichtigkeit prüften.

Zur Bestimmung der aus der Hülse herausdialysierten Saponinmenge wurde die Hämolyse herangezogen. Wir bestimmten ein für allemal den hämolytischen Index unserer Saponine. Obgleich stets Rattenblut verwendet wurde, mußten wir trotzdem mit einer verschiedenen Empfindlichkeit des Blutes rechnen und zogen daher bei allen Hämolyseversuchen ein Testobjekt heran [*Wasicky* (3), *Kofler* (4)], wodurch das Blut sozusagen geeicht wurde, so daß die zu verschiedenen Zeiten durchgeführten hämolytischen Bestimmungen untereinander vergleichbar waren.

Beim Aufstellen des Versuchs wurde eine abgewogene Menge Saponin in Wasser gelöst und in die Hülse eingefüllt. Diese

wurde in ein Gefäß mit einer abgemessenen Menge Wasser gestellt. Die Gefäße waren so gewählt, daß bei 12 ccm Saponinlösung in der Hülse und 40 ccm Wasser im Gefäß die Flüssigkeitsspiegel innen und außen gleich hoch standen. In die Hülsen wurde so viel Saponin gegeben, daß nach dem Hinausdialysieren des 100. Teiles die Außenflüssigkeit gerade hämolytisch wirken mußte. Zur Prüfung der Hämolysewirkung wurde die Außenflüssigkeit in bestimmten Zeitabschnitten durchgerührt, dann wurde 1 ccm herauspipettiert, durch Zusatz von 0,008 g NaCl blutisotonisch gemacht und mit 1 ccm einer 2proz. Blutaufschwemmung versetzt. Nach einer Stunde wurde die Hämolyse als positiv oder negativ abgelesen. Durch Zusatz von 1 ccm Wasser wurde die Außenflüssigkeit wieder auf 40 ccm gebracht. Da die Außenflüssigkeit bei der Anstellung des Hämolyseversuchs mit gleichen Teilen Blutaufschwemmung verdünnt wird, muß also für den positiven Ausfall des Versuchs in der Außenflüssigkeit so viel Saponin vorhanden sein, daß dadurch 80 ccm Flüssigkeit gerade noch hämolytisch wirken, also beispielsweise beim Digitonin 80 : 195,000 = 0,00041 g. In die Hülse wurde daher nach dem oben Gesagten die hundertfache Menge gegeben. Die Außenflüssigkeit wurde zuerst in kurzen Zeitabständen, später täglich einmal untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I.

Saponin	Hämolytischer Index	Saponin in der Hülse g	Hämolyse in der Außenflüssigkeit nach
Digitonin	195,000	0,041	16 Stunden
Primulasäure	193,000	0,041	24 "
Roßkastaniensaponin .	25,000	0,320	36 "
Sapotoxin	44,000	0,181	42 "
Saponin. pur. albiss. . .	25,000	0,320	48 "
Saponin Sthamer . . .	25,000	0,320	48 "
Powderedsaponin . . .	80,000	0,100	3 Tagen
Gypsophilasaponin . .	190,000	0,421	negativ nach 8 Tagen
Senegin	27,800	0,290	ebenso

Die gewählte Versuchsanordnung hat den Nachteil, daß die Konzentration der Lösungen und damit auch das Konzentrationsgefälle bei den einzelnen Saponinen ein verschiedenes ist. Da jedoch bei der Mehrzahl der verwendeten Saponine das Molekulargewicht nicht mit Sicherheit bekannt ist, wäre auf keinen Fall ein Arbeiten mit äquimolekularen Lösungen möglich gewesen. Die Resultate selbst sprechen gegen die Annahme, daß die verschiedene Konzentration der Lösungen einen wesentlichen Einfluß ausgeübt habe. Die beiden Saponine, welche am raschesten dialysierten, waren in viel größerer Verdünnung vorhanden als die meisten anderen. Es ist wohl nicht anzunehmen,

daß das Molekulargewicht des Digitonins und der Primulasäure 10- oder 20mal kleiner ist als beispielsweise das des Senegins.

Bei mehrfacher Wiederholung der Versuche unter teilweiser Abänderung der Versuchsbedingungen erhielten wir zwar mitunter geringfügige Abweichungen der absoluten Werte, das relative Verhältnis zwischen den einzelnen Saponinen blieb aber gleich.

Aus dem oben beschriebenen Versuch geht hervor, daß vom Digitonin in 16 Stunden 1 Proz. des in der Hülse vorhandenen Saponins herausdialysiert war, während beim Gypsophilasaponin und Senegin selbst nach 8 Tagen nicht einmal 1 Proz. in der Außenflüssigkeit nachweisbar war.

Glaser und *Krauter* (5) halten es für wahrscheinlich, daß das von ihnen vor kurzem aus Polygala amara gewonnene saure und neutrale Saponin mit der Polygalasäure bzw. dem Senegin identisch seien. Da nach den Angaben der beiden Autoren ihre Saponine dialysabel sind, so spricht unser Befund, wonach Senegin nicht dialysabel ist, gegen die Identität von Senegin mit dem neutralen Saponin von Polygala amara.

In einer gemeinsam mit *Schrutka* (6) durchgeführten vergleichenden Untersuchung über die physiologischen Wirkungen verschiedener Saponine wurde unter anderem zahlenmäßig die bekannte Tatsache verfolgt, daß die Saponine bei oraler Verabreichung weit weniger giftig wirken als bei intravenöser Injektion. Dabei ergab sich, daß das Verhältnis zwischen letaler intravenöser und oraler Dosis von Saponin zu Saponin weitgehend verschieden ist. Beim Roßkastaniensaponin ist die orale, letal wirkende Dosis das Dreifache der intravenösen, beim Saponin *Sthamer* das 300fache. Diese Unterschiede stehen wohl mit den verschiedenen Resorptionsverhältnissen der einzelnen Saponine im Zusammenhang. Es lag daher der Gedanke nahe, daß auch das mehr oder weniger große Dialysiervermögen beim Durchtritt durch die Darmwand eine Rolle spielen könnte. Dies läßt sich jedoch als allgemeine Regel nicht erkennen, wie der Vergleich der Werte aus der erwähnten Arbeit mit den Ergebnissen der Dialysierversuche in Tabelle II zeigt.

Tabelle II.

Saponin	Tödliche Dosis in mg pro g Maus		Die intravenöse Dosis ist ... mal höher als die orale
	intravenös	per os	
Digitonin	0,010	0,09	9
Primulasäure	0,015	0,20	13
Gypsophilasaponin	0,015	2,00	130
Sapotoxin	0,020	1,00	50
Saponin Sthamer	0,020	6,00	300
Senegin	0,045	1,00	22
Saponin. pur. albiss.	0,060	4,00	66
Powderedsaponin	0,100	1,50	15
Roßkastaniensaponin	0,900	3,00	3

Immerhin sind aber gewisse Zusammenhänge zwischen Dialysiervermögen und Resorbierbarkeit ersichtlich: Die drei am leichtesten dialysierbaren Saponine: Digitonin, Primulasäure und Roßkastaniensaponin, haben die niedrigsten Verhältniszahlen. Interessant ist der Vergleich zwischen Primulasäure und Gypsophilasaponin. Beide haben bei intravenöser Anwendung dieselbe tödliche Dosis, per os dagegen wirkt die verhältnismäßig leicht dialysable Primulasäure zehnmal stärker als das nicht dialysable Gypsophilasaponin.

Zweifellos sind die Verhältnisse dadurch kompliziert, daß im Verdauungstrakt ein teilweiser Abbau der Saponine erfolgt, der bei den einzelnen Saponinen verschieden weitgehend sein kann.

Reinigung der Saponine durch Elektrodialyse.

Die Reinigung von Saponinen mit Hilfe der gewöhnlichen Dialyse st bekanntlich langwierig und führt häufig nicht zum Ziele, da die Saponine namentlich anorganische Verunreinigungen mit großer Kraft festhalten. *Kofler* und *Dafert* zogen zur Reinigung der Saponine der Gypsophila paniculata zuerst die Elektrodialyse heran, sie benutzten den Apparat von *Pauli* (7). Dadurch war es möglich, den Aschengehalt der Saponine von mehreren Prozenten in wenigen Stunden auf einige Hundertstel Prozent herabzudrücken. Auch zur Reinigung eines sauren Saponins ließ sich die Elektrodialyse mit Vorteil verwenden, wie der eine von uns an der Primulasäure, dem sauren Saponin der Primula veris, zeigen konnte. Das Saponin wurde durch Natronlauge in Wasser in Lösung gebracht. Bald nach dem Einschalten des Stromes zeigte sich in der vorher klaren Lösung eine langsam zunehmende Trübung. Nach einigen Tagen hatte sich das Saponin in der Mittelkammer als feines weißes Pulver mit einem Aschengehalt von 0,05 Proz. niedergeschlagen.

Wir unterwarfen die oben angeführten Saponine der Elektrodialyse. Zur Verwendung gelangte ein *Pauli*scher Apparat mit zwei Platinelektroden, die Mittelkammer faßte 40 ccm. In der Regel wurde 1 g Saponin in 40 ccm Wasser gelöst. Nach der Elektrodialyse wurde die Lösung im Vakuum eingedampft. Die Veraschung wurde in kleinen Platintiegeln durchgeführt und die Wägungen auf der Mikrowage vorgenommen. Schon nach 6- bis 12stündiger Elektrodialyse war der größte Teil der anorganischen Verunreinigungen entfernt. Wir setzten jedoch die Elektrodialyse meist mehrere Tage, in der Regel 3 bis 10 Tage, fort, bis kaum mehr eine Gasentwicklung zu sehen war. Mit Ausnahme des Digitonins und der Primulasäure war die Substanzmenge eine geringere geworden.

Tabelle III.

Saponin	Aschengehalt vor der Elektrodialyse Proz.	Aschengehalt nach der Elektrodialyse Proz.
Saponin. pur. albiss. .	2,05	0,00
Digitonin	0,05	0,01
Gypsophilasaponin . .	7,10	0,04
Roßkastaniensaponin .	2,33	0,11
Senegin	1,97	0,42
Powderedsaponin . . .	8,60	0,30
Sapotoxin	1,17	0,02
Saponin Sthamer . . .	8,50	0,09
Primulasäure	0,43	0,05

In Tabelle III ist der Aschengehalt der Saponine vor und nach der Elektrodialyse angegeben. Mit Ausnahme des Digitonins und der Primulasäure war der Aschengehalt der verwendeten Saponine ein großer. Durch die Elektrodialyse lassen sich die anorganischen Verunreinigungen der Saponine ganz oder sehr weitgehend entfernen. Unter der Voraussetzung, daß die noch vorhandenen geringfügigen Verunreinigungen vorwiegend Ca- und Mg-Salze sind, wurde nach dem Vorschlag von *Pauli* (7) der Versuch gemacht, die Erdalkalien durch Alkalisalze zu verdrängen. Wir elektrodialysierten Gypsophilasaponin so lange, bis die Gasentwicklung nur mehr eine schwache war, und setzten dann an zwei aufeinander folgenden Tagen je 1 ccm einer n/100 Kaliumsulfatlösung zu. Nach Beendigung der Elektrodialyse betrug der Aschengehalt des Saponins nur noch 0,02 Proz. Es scheint also auch bei den Saponinen ein Zusatz einer geringen Menge Alkalisalz einen günstigen Einfluß bei der Elektrodialyse auszuüben, wie dies *Pauli* bei anderer Gelegenheit beobachtete.

Um eine bei der Elektrodialyse möglicherweise erfolgte Veränderung der Saponine feststellen zu können, untersuchten wir den hämolytischen Index. Es zeigte sich, daß die Hämolysewirkung in keinem Falle abgenommen hatte. Bei einigen Saponinen erfolgte eine Zunahme der hämolytischen Kraft, z. B. beim Saponin Sthamer, beim Saponin. pur. albiss. und beim Sapotoxin.

Zur Erklärung dieser Zunahme des hämolytischen Index nahmen wir anfangs an, daß die durch Elektrodialyse erhaltenen Substanzen weitgehend von hämolytisch unwirksamen Verunreinigungen befreit seien und deshalb einen viel höheren Prozentsatz an reinem Saponin aufweisen als vor der Elektrodialyse. Daß diese Erklärung nur zum Teil richtig sein kann, geht aus folgendem Versuch hervor: Wir stellten 50 ccm einer 0,5 proz. Sapotoxinlösung her. 40 ccm davon elektrodialysierten wir durch 7 Stunden. Hierauf wurde die Hämolysewirkung der dialysierten und der nicht dialysierten Lösung verglichen. Wir

nahmen dabei an, daß beide Lösungen 0,5 Proz. Sapotoxin enthalten, verdünnten mit physiologischer Kochsalzlösung auf 0,01 Proz. und bestimmten den hämolytischen Index des Sapotoxins. In der nicht vorbehandelten Flüssigkeit betrug er 1 : 44000, in der elektrodialysierten Flüssigkeit 1 : 90000. Da während der Elektrodialyse keine Konzentrierung der Flüssigkeit eintrat, war also die Sapotoxinmenge pro Kubikzentimeter sicher nicht größer, sondern eher kleiner geworden. Die Reaktion war vor und nach der Elektrodialyse gegen Lackmus neutral, so daß dadurch ein Versuchsfehler nicht zu erwarten war. Zur Erklärung der bedeutenden Zunahme der hämolytischen Wirksamkeit der Lösung scheinen uns zwei Annahmen möglich. Es könnten im Handelssapotoxin neben dem eigentlichen Saponin als Verunreinigung Substanzen vorhanden sein, welche hemmend auf die Hämolyse wirken. Entfernt man die Substanzen durch Elektrodialyse, so vermag dieselbe Sapotoxinmenge eine größere Hämolysewirkung zu entfalten als vorher. Es könnte ferner das Saponin chemisch verändert worden und die neu entstandene Substanz stärker wirksam sein als das ursprüngliche Saponin. Um eine hydrolytische Spaltung kann es sich dabei wohl nicht handeln, da die Flüssigkeit durch die Elektrodialyse nicht getrübt wurde. Vielleicht gelingt es durch weitere Untersuchungen, bei denen unter anderem auf den Einfluß der Kationen geachtet werden muß, diese Vorgänge zu klären. Die gleichen Versuche stellten wir beim Saponin. pur. albiss. und Senegin an. Beim ersteren nahm die Hämolysewirkung der Flüssigkeit um ungefähr 40 Proz. zu, beim letzteren war eine Zunahme eben gerade wahrnehmbar.

Anwendung der Elektrodialyse zum Nachweis von Saponin.

Die Elektrodialyse eignet sich auch in ausgezeichneter Weise zum Nachweis von Saponin in Limonaden und anderen Flüssigkeiten.

Bekanntlich wird beim Saponinnachweis nach *Brunner-Rühle* (8, 9), nach *Müller-Hössly* (10) und ferner *Rosenthaler* (11) das Saponin bzw. Sapogenin aus der betreffenden Flüssigkeit isoliert und dann durch Hämolysewirkung oder Farbenreaktionen als Saponin identifiziert. Das Verfahren von *Sormani* (12) verzichtet auf eine Isolierung des Saponins. Die zu untersuchende Flüssigkeit wird neutralisiert, von eventuell vorhandenem Alkohol befreit, durch Zusatz von Natriumcitrat blutisotonisch gemacht und direkt auf Hämolysewirkung geprüft. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der Schwierigkeit, die Flüssigkeit einzuengen, und in der Herstellung der Blutisotonie.

Gelegentlich einer Untersuchung über den Einfluß von Saponindrogen auf die Diurese, die der eine von uns gemeinsam mit *Kollert* und *Hauptmann* (13) durchführte, ergab sich die Notwendigkeit, den Harn der Patienten auf die Anwesenheit von Saponin zu untersuchen. Da im nativen, wenn nötig neutralisierten, Harn der Versuchspersonen

niemals eine hämolytische Wirkung feststellbar war, verfuhren wir zur Anreicherung möglicherweise vorhandener geringer Mengen von Saponin oder hämolytisch wirkendem Sapogenin in folgender Weise: 40 ccm Harn wurden durch 6 bis 10 Stunden der Elektrodialyse unterworfen. Dabei ging das spezifische Gewicht auf 1003 bis 1004 herab. Dann wurden die 40 ccm Flüssigkeit neutralisiert, auf 8 ccm eingeengt, mit 0,07 g NaCl versetzt und auf ihre hämolytische Wirkung geprüft. In keinem einzigen Falle wurde auch nach Verabreichung großer Saponinmengen Hämolyse beobachtet. Dieses Ergebnis fand durch spätere Versuche über die Resorptionsverhältnisse der Saponine seine Erklärung (14). In Kontrollversuchen, in denen dem Harn kleine Mengen von Saponin zugesetzt wurden, konnte der größte Teil des Saponins quantitativ bestimmt werden.

Dasselbe Verfahren versuchten wir auf Limonaden anzuwenden. Es wurden mehrere Limonaden, zum Teil aus verschiedenen Wiener Fabriken, zum Teil selbst hergestellt, der Elektrodialyse unterworfen. Die roten oder gelben Farbstoffe verschwanden schon nach 4 bis 6 Stunden aus der Mittelkammer, ein Umstand, der für die spätere Ablesung von Vorteil ist. Die saure Reaktion gegen Lackmus verschwand nach 24 bis 36 Stunden. In Kontrollversuchen wurden 40 ccm Limonade 12 bis 24 Stunden elektrodialysiert. Die in einzelnen Fällen noch vorhandene schwach saure Reaktion wurde durch Neutralisation mit Natriumcarbonat beseitigt. Die Flüssigkeit zeigte weder in diesem Zustande noch nach dem Einengen auf 2 ccm beim Zusammenbringen mit derselben Menge Blutaufschwemmung eine Hämolysewirkung. Sollte die Flüssigkeit ohne Einengen auf Hämolyse geprüft werden, so wurden 0,5 Proz. NaCl zugesetzt. Nach dem Einengen auf $^1/_{10}$ oder $^1/_{20}$ des ursprünglichen Volumens wurde dieser Zusatz unterlassen.

In einer Reihe von Versuchen versetzten wir nun je 40 ccm Limonade mit kleinen Mengen Saponin und prüften die Flüssigkeit nach der Elektrodialyse auf Hämolysewirkung, und zwar einen Teil ohne Einengen, einen anderen Teil nach dem Einengen.

Tabelle IV.

Saponin	In 40 ccm Limonade g	Hämolyse nach Elektrodialyse
Saponin Sthamer . .	0,000 20	keine
Saponin. pur. albiss. .	0,000 50	vollständig
Gypsophilasaponin . .	0,000 30	„
Powderedsaponin . .	0,000 45	„

Es zeigte sich also, daß in 40 ccm Limonade mit Ausnahme des ersten Versuchs noch weniger als 1 mg Saponin nachweisbar war. In weiteren Versuchen trachteten wir, möglichst quantitativ zu arbeiten,

indem wir darauf achteten, wieweit die Flüssigkeit nach der Elektrodialyse eingeengt werden mußte, um gerade Hämolysewirkung zu zeigen. Dabei war es allerdings notwendig, etwas größere Mengen Saponin zuzusetzen. Wir führen zwei Beispiele aus dieser Reihe an.

Versuch 1. 40 ccm Limonade wurden mit 0,001 g Saponin Sthamer versetzt und 24 Stunden der Elektrodialyse unterworfen. Die noch vorhandene ganz schwach saure Reaktion wurde durch Zusatz einiger Tropfen einer 2proz. Natriumcarbonatlösung neutralisiert. Dann engten wir auf 4 ccm ein und stellten mit dieser Flüssigkeit in der üblichen Weise einen Hämolyseversuch auf, wie zur Bestimmung des hämolytischen Index. Es trat Hämolyse gerade noch in jener Eprouvette ein, welche 1 ccm Blutaufschwemmung + 0,6 ccm physiologische Kochsalzlösung + 0,4 ccm der eingeengten Flüssigkeit enthielt. Das in der Gesamtflüssigkeit vorhandene Saponin vermochte demnach in 20 ccm Flüssigkeit hämolytisch zu wirken. Legt man für das Saponin Sthamer einen hämolytischen Index von 1 : 25000 zugrunde, so ergibt sich (20 : 25000) als Gesamtgehalt an Saponin 0,0008 g.

Versuch 2. 40 ccm Limonade wurden mit 0,002 g Gypsophilasaponin versetzt. Nach der Elektrodialyse mußte auf 120 ccm verdünnt werden. Es trat bei 1 ccm Blutaufschwemmung + 0,2 ccm physiologische Kochsalzlösung + 0,8 ccm Limonadenflüssigkeit eben Hämolyse ein, also bei einer Lösung des noch vorhandenen Saponins in 300 ccm Flüssigkeit. Die Berechnung mit Hilfe des hämolytischen Index (300 : 190000) ergab 0,00158 g Saponin.

Durch Anwendung der Elektrodialyse lassen sich in Limonaden und manchen anderen Flüssigkeiten mit Hilfe der Hämolyse noch Bruchteile eines Milligramms Saponin nachweisen. Wenn etwas größere Mengen eines bekannten Saponins vorhanden sind, läßt sich die Bestimmung annähernd quantitativ gestalten.

Eine Bestimmung der Schaumzahl war in den meisten Fällen infolge der großen Verdünnung und den geringen Flüssigkeitsmengen nach dem Einengen nicht möglich.

Zusammenfassung.

Es wurde bei einer Reihe von Saponinen die Zeit bestimmt, in der unter denselben Versuchsbedingungen 1 Proz. des Saponins aus einer wässerigen Lösung durch eine Pergamenthülse dialysiert.

Bei den beiden kristallisierten Saponinen Digitonin und Primulasäure war dies nach 16 bzw. 24 Stunden der Fall. Die übrigen Saponine brauchten länger. Beim Gypsophilasaponin und Senegin war auch nach 8 Tagen noch nicht 1 Proz. Saponin in der Außenflüssigkeit nachweisbar.

Aus dem Vergleich dieser Resultate mit früheren Untersuchungen ergibt sich ein gewisser Zusammenhang zwischen der Dialysierbarkeit und den Resorptionsverhältnissen vom Magen-Darm aus. Die rascher dialysierenden Saponine scheinen auch leichter resorbiert zu werden als die anderen. Eine direkte Proportionalität besteht allerdings nicht.

Zur Reinigung der Saponine von Mineralsubstanzen läßt sich zweckmäßig die Elektrodialyse benutzen. Die hämolytische Wirkung der Saponine war durch die Elektrodialyse entweder unverändert geblieben oder größer geworden.

Diese Zunahme der Hämolysewirkung ist nicht nur durch die Entfernung indifferenter Verunreinigungen zu erklären, sondern muß bei manchen Saponinen noch andere Ursachen haben.

Die Elektrodialyse läßt sich auch zum Nachweis von Saponinen in Limonaden heranziehen, indem man die zu untersuchende Flüssigkeit zuerst der Elektrodialyse unterwirft, einengt und auf hämolytische Wirkung prüft. Es lassen sich noch Bruchteile eines Milligramms in 40 ccm Limonade nachweisen. Wenn etwas größere Mengen eines bekannten Saponins vorhanden sind, kann der Nachweis auch quantitativ gestaltet werden.

Literatur.

1) *Kofler* und *Dafert*, Ber. d. Deutsch. pharm. Ges. **33**, 215, 1923. — 2) *Kofler*, Arch. f. Pharm. u. Ber. d. Deutsch. pharm. Ges. **1924**, Heft 4. — 3) *Wasicky*, Pharm. Post **46**, 989, 1913. — 4) *Kofler*, Pharm. Monatsh. 1922 und 1924. — 5) *Glaser* und *Krauter*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **1924**, S. 1604. — 6) *Kofler* und *Schrutka*, diese Zeitschr. 1925. — 7) *Pauli*, ebendaselbst **152**, 355, 1924; *Adolf* und *Pauli*, ebendaselbst **152**, 360, 1924. — 8) *Brunner*, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **5**, 1197, 1902. — 9) *Rühle*, ebendaselbst **16**, 165, 1908; **23**, 566, 1912; **27**, 192, 1914. — 10) *Müller-Hössly*, ref. Chem. Centralbl. **1917**, II, S. 430. — 11) *Rosenthaler*, Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußm. **25**, 154, 1913. — 12) *Sormani*, ebendaselbst **23**, 561, 1912. — 13) *Kollert*, *Kofler* und *Hauptmann*, Wien. klin. Wochenschrift, **1924**, Nr. 23. — 14) *Kofler*, *Kollert* und *Grill*, ebendaselbst **1925**, Nr. 13.

Zur Adsorption von Giften an Kohle. II.

Von

Elisabeth Dingemanse und Ernst Laqueur.

(Aus dem pharmako-therapeutischen Laboratorium der Universität von Amsterdam.)

(Eingegangen am 25. Mai 1925.)

In einer vorhergehenden Mitteilung hatte der eine von uns (*Laqueur*) in Gemeinschaft mit *Sluyters*[1]) festgestellt, daß eine neue Pflanzenkohle „*Supra-Norit*" gegenüber den von uns untersuchten Stoffen stärker adsorbiert als die mit Recht als gut bekannte *Mercksche* „*Carbo medicinalis*". Das praktisch-therapeutische Interesse, das der Grad des Adsorptionsvermögens hat, ist auch behandelt; es ist dort auseinandergesetzt, daß pharmakologisch *die* Kohlensorte den höchsten Wert hat, die Gifte relativ am *stärksten* adsorbiert. In der letzten Zeit ist von *Merck* eine Kohle „*Neu*" in den Handel gekommen; auch die *Norit-Maatschappij* hat uns eine angeblich noch besser adsorbierende Kohle, „*Medizinal-Supra-Norit*", zur Verfügung gestellt, und endlich konnten wir auch durch die Freundlichkeit der Gesellschaft *Norgine* die von *Wiechowski* angegebene und gerühmte Kohle zum Vergleich heranziehen.

Dabei haben wir, wie auch schon anderseitig angegeben, uns auch davon überzeugen müssen, daß eine selbst unter allen Kautelen angestellte Adsorptionsprüfung mit Methylenblau (Probe nach *Wiechowski*) keineswegs ausreichend ist, um ein Urteil über das Adsorptionsvermögen einer Kohleart zu fällen. Es liegt dies nicht daran, daß die Parallelität der Adsorption von Farbstoffen und z. B. von Alkaloiden nicht vollkommen gewahrt ist, sondern daran, daß die Methode, womit die Adsorption von Methylenblau nach dem Verfahren von *Wiechowski* festgestellt wird, doch eine zu unsichere ist, auch wenn man stets dasselbe Methylenblaupräparat benutzt. —

Die Methode in unseren jetzigen Versuchen war im wesentlichen die gleiche wie in der vorhergehenden Mitteilung (stets Doppelbestim-

---

[1]) Diese Zeitschr. **156**, 303, 1925.

mungen mit je zwei Titrationen). Wir untersuchten die Adsorption von *Oxalsäure*, *Sublimat-* und *Strychnin*lösungen. Bei der Bestimmung der nicht adsorbierten Anteile benutzten wir im Falle des Strychnins außer Titrieren des Säurerestes auch noch die von *Kolthoff*[1]) angegebene $KMnO_4$-Methode.

Neben der praktisch wichtigen Frage nach der Gifte am besten adsorbierenden Kohleart haben wir noch kurz einige Fragen von mehr theoretischem Interesse gestreift: unter anderem Abhängigkeit der Adsorption vom N_2-Gehalt der Kohle; ferner von ihrer Reaktion (saure oder alkalische Kohle).

Versuche.

Verglichen wurde also das Adsorptionsvermögen der neuen Pflanzenkohle „Medizinal-Supra-Norit" mit der bereits ausführlich untersuchten „Supra-Norit"[2]), ferner der Carbo animalis „Norgine" und mit einer neuen Tierkohle von *Merck*, „Carbo medicinalis *Merck* Neu", und endlich der ebenfalls bereits geprüften „Carbo animalis *Merck*". Den *Wasser-* und *Aschegehalt* in den untersuchten Kohlearten zeigt die Tabelle I. Die Kohle wurde bei 120° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Zahlen in der Tabelle sind das Mittel von zwei bis drei Bestimmungen.

Tabelle I.

Wasser- und Aschegehalt.

Kohleart	Wasser Proz.	Asche Proz.
Supra-Norit	7,00	0,44
Medizinal-Supra-Norit	0,35	0,93
Carbo animalis „Norgine"	14,25	4,70
Carbo medicinalis *Merck* „Neu"	28,60	1,08
Carbo animalis *Merck* 15 107	33,94	7,2

Sublimatversuche.

50 ccm einer 0,5proz. Sublimatlösung wurden mit wechselnden Mengen Kohle gut geschüttelt, 10 Minuten stehengelassen und dann 10 Minuten zentrifugiert. Die obenstehende Flüssigkeit wird filtriert und in einem aliquoten Teil des Filtrats das nicht adsorbierte Sublimat mit 0,03 n Kaliumcyanidlösung (Indikator Phenolphthalein) bestimmt. Zur Kontrolle wurde das Sublimat auch nach einer zweiten Methode bestimmt. Zu der Sublimatlösung wird ein Überschuß von Cyankaliumlösung hinzugefügt, und dieser Überschuß mit einer Silbernitratlösung zurücktitriert. Die beiden Methoden ergaben gut übereinstimmende Resultate, wie aus der Tabelle II ersichtlich ist.

[1]) Pharm. Weekbl. 58, 650, 1921.
[2]) l. c.

Tabelle II. Adsorption von Sublimat an Medizinal-Supra-Norit.

Kohle mg	50 ccm 0,5proz. Sublimatlösung titriert mit KCN (Indikator Phenolphthalein) Proz. adsorbiert	50 ccm 0,5proz. Sublimatlösung der Überschuß von KCN zurücktitriert mit $AgNO_3$-Lösung Proz. adsorbiert
100	34,8	35,1
250	66,4	66,2
500	86,1	86,5
750	93,05	93,25

Die Tabelle III gibt die Adsorption von Sublimat, bestimmt nach der ersten Methode.

Tabelle III. Adsorption von Sublimat.

Kohleart	50 ccm 0,5 proz. Sublimatlösung, adsorbiert				
	100 mg Proz.	200 mg Proz.	250 mg Proz.	500 mg Proz.	750 mg Proz.
Supra-Norit	30,1	53,6	60,0	83,6	92,5
Medizinal-Supra-Norit	35,2	58,7	—	86,7	—
Carbo animalis „Norgine“	—	—	53,5	74,6	84,5
Carbo medicinalis *Merck* „Neu“	27,8	50,2	—	80,2	—

Die Zahlen sind hier das Mittel — wie stets — aus vier Bestimmungen, von denen je zwei aus einem Zentrifugenrohr gemacht sind. Sublimat wird also in der Tat von der Medizinal-Supra-Noritkohle stärker adsorbiert als von der Supra-Noritkohle. Die Carbo animalis Norgine dagegen adsorbiert deutlich schwächer als beide Supra-Noritarten, sie ist noch schwächer als die *Merck* „Neu“.

Wie wir weiter unten sehen werden, gilt dasselbe von Carbo animalis Norgine im Vergleich zu den Supra-Noritkohlen hinsichtlich der Adsorption von Oxalsäure und Strychninnitrat, dagegen ist in diesen Fällen die Carbo animalis Norgine der *Merck*schen Kohle überlegen.

Adsorption von Strychninnitrat.

50 ccm einer 0,5proz. Strychninnitratlösung wurden mit wechselnden Mengen Kohle geschüttelt, 10 Minuten stehengelassen und 10 Minuten zentrifugiert. Nach Filtration wurden in einem Teile des Filtrats das nichtadsorbierte Strychninnitrat bestimmt, erstens durch Titration mit n/100 Lauge (Indikator Phenolphthalein), zweitens nach der Methode *Kolthoff*:

1 ccm der Strychninnitratlösung wird mit 25 ccm n/10 $KMnO_4$-Lösung und 10 ccm verdünnter Schwefelsäure 24 Stunden im geschlossenen Erlenmeyer bei Zimmertemperatur stehengelassen; dann setzt man einige Kubikzentimeter 10proz. Kaliumjodidlösung hinzu, schüttelt und titriert das durch das nicht verbrauchte $KMnO_4$ in Freiheit gesetzte Jod mit n/10 Thiosulfatlösung zurück. Zur Berechnung wurde bei jeder Serie gleichzeitig die von 1 ccm 0,5proz. Strychninnitrat verbrauchte Menge $KMnO_4$ bestimmt.

Tabelle IV. Adsorption von Strychninnitrat.

Kohleart	50 ccm 0,5 proz. Strychninnitrat											
	250 mg Kohle bestimmt				500 mg Kohle bestimmt				750 mg Kohle bestimmt			
	mit KOH		nach *Kolthoff*		mit KOH		nach *Kolthoff*		mit KOH		nach *Kolthoff*	
	I*) Proz.	II*) Proz.	I*) Proz.	II*) Proz.	III*) Proz.	IV*) Proz.	III*) Proz.	IV*) Proz.	V*) Proz.	VI*) Proz.	V*) Proz.	VI*) Proz
Medizinal-Supra-Norit	77,4	77,8	74,2	71,2	98,4	98,4	95,2	90,4	100,0†)	100,0†)	100,0	97,6
Supra-Norit	59,7	59,7	57,4	54,0	93,9	93,1	92,8	90,4	100,0†)	100,0†)	100	—
Carbo anim. „Norgine“	47,2	48,3	41,8	44,8	79,6	79,6	74,8	79,6	95,6	95,6	94,1	98,8
Carbo anim. *Merck*	34,7	34,3	33,9	31,5	64,9	65,7	56,2	58,6	80,6	80,6	79,0	78,4
Carbo medic. *Merck* „Neu“	24,2	24,6	24,3	18,6	39,9	39,1	38,7	41,1	56,0	56,0	53,7	55,0

*) Bei den einzelnen Versuchen mit den jeweiligen Kohlenmengen sind die Proben, die zu Reihen gehören, die unter derselben römischen Nummer stehen, aus demselben Zentrifugenglas genommen, z. B. in der ersten Zeile bei 250 mg Medizinal-Supra-Norit wurden als adsorbiert gefunden aus Zentrifugenglas I bei Titration mit KOH, 77,4, und bestimmt nach *Kolthoff* 74,2; aus Zentrifugenglas II mit KOH 77,8 Proz., nach *Kolthoff* 71,2 Proz.

†) Diese Lösungen zeigten auch mit Jodkalium-Quecksilberjodid keinen Niederschlag.

Auch hier steht die Medizinal-Supra-Noritkohle an erster Stelle, während die Carbo animalis „Norgine“ hinter den beiden Noritkohlen zurückbleibt, die *Merck*schen Kohlen aber übertrifft. Die *Merck*sche Kohle „Neu“ leistet am wenigsten, viel weniger als die ältere *Merck*sche Kohle. Die Unterschiede in der Adsorption zwischen der besten Sorte Medizinal-Supra-Norit und der neuesten Kohle von *Merck* „Neu“ beträgt wenigstens etwa 100 Proz., höchstens über 300 Proz., d. h. es wird unter gleichen Umständen von der gleichen Menge Kohle doppelt bis dreimal so viel Gift adsorbiert. Norgine steht etwa in der Mitte. Dies sind Unterschiede, die von großer praktischer Bedeutung sind (s. vorige Mitteilung). Beide Methoden, die Titrationen der Säure wie die Bestimmung mit $KMnO_4$ nach *Kolthoff*, liefern das gleiche Ergebnis, obwohl die Zahlen, gewonnen mit den beiden Methoden untereinander zum Teil deutlich voneinander abweichen. Wir sind den Gründen vorläufig nicht weiter nachgegangen, da uns hauptsächlich der Unterschied des Adsorptionsvermögens der verschiedenen Kohlen interessierte.

Adsorption von n/10 Oxalsäure.

50 ccm n/10 Oxalsäure wurden mit wechselnden Mengen Kohle, wie oben angegeben, behandelt. Im Filtrat wurde das Anion und Kation nebeneinander bestimmt durch Titration mit n/10 $KMnO_4$ in saurer Lösung und mit n/10 Lauge (Indikator: Phenolphthalein).

Auch hier benutzten wir zwei Methoden nebeneinander bzw. suchten die Adsorption des Anions und des Kations nebeneinander zu bestimmen. Da nach den früheren Erfahrungen [s. *Rona* und *Michaelis*[1])

[1]) Diese Zeitschr. **97**, 57, 1919.

Tabelle V. Adsorption von Oxalsäure.

Kohleart	50 ccm n/10 Oxalsäure					
	250 mg Kohle, adsorbiert		500 mg Kohle, adsorbiert		750 mg Kohle, adsorbiert	
	Anion Proz.	Kation Proz.	Anion Proz.	Kation Proz.	Anion Proz.	Kation Proz.
Medizinal-Supra-Norit	14,9	15,6	26,2	27,0	38,1	37,8
Supra-Norit	13,4	13,7	25,2	23,9	32,7	33,6
Carbo animalis Norgine	14,9	16,2	26,7	28,9	35,2	39,8
Carbo medicinalis *Merck* „Neu" .	12,9	13,2	24,8	23,9	34,7	33,5
Carbo animalis *Merck* 15 107 . .	10,4	10,5	20,5	18,3	26,7	28,4

und unsere erste Mitteilung] ein Austausch von Ionen bei der Adsorption stattfinden kann, so ist das Verschwinden der (H˙) der Oxalsäure kein zwingender Beweis, daß gleichviele Oxalsäureanionen adsorbiert sind; es können mehr sein, wenn an ihrer Stelle z. B. Cl′ ausgetreten sind, es können aber weniger sein, wenn für die (H˙) Na˙ und dergleichen in die Lösung kamen. Ein solcher Austausch wird vor allem von der qualitativen wie quantitativen Zusammensetzung der Asche abhängen.

Die Adsorption hinsichtlich Oxalsäure zeigt auffallend kleine Unterschiede bei den verschiedenen Kohlearten. Am besten, wenn auch nur wenig den anderen überlegen, ist Medizinal-Supra-Norit, soweit es die für die Praxis wichtige Adsorption des Anions betrifft. Carbo animalis Norgine kommt ihr recht nahe, Carbo animalis *Merck* steht an letzter Stelle. Im allgemeinen ist zwischen Adsorption und Anion und Kation keine deutliche, sicher außerhalb der Fehlergrenzen liegende Differenz. Nur bei der größten Menge (750 mg) von Carbo animalis Norgine ist die Adsorption des Anions deutlich schwächer; dies ist wohl der Zusammenstellung der Asche zur Last zu legen.

Adsorption von Methylenblau.

Die Adsorption von Methylenblau nach dem Verfahren von *Wiechowski*[1]) ergab die folgenden Resultate:

Je 100 mg der verschiedenen bei 120° getrockneten Kohlenarten wurden 1 Minute geschüttelt mit steigenden Mengen einer 0,15proz. Methylenblaulösung; als Grenze wird diejenige Menge bezeichnet, bei der die Farbe der Flüssigkeit nach Zentrifugieren noch gerade sichtbar ist.

Wir haben anfangs gemeint (s. erste Mitteilung), daß diese Methode zu orientierenden Versuchen sehr gut zu benutzen wäre, mußten aber nach unseren letzten Versuchen dies als irrtümlich erkennen. Zum Beweis der Unsicherheit der Methode wollen wir einige Zahlen anführen.

[1]) Therapie der Gegenwart 24, 129. 1922.

Tabelle VI. Adsorption von Methylenblau nach *Wiechowski.*

Kohleart	0,15 proz. Methylenblaulösung: Anzahl ccm hinzugefügt Lösung blau, 1. Versuch	2. Versuch	Anzahl ccm hinzugefügt Lösung farblos, 1. Versuch	2. Versuch
Supra-Norit	20	40	19	38
Medizinal-Supra-Norit	18	—	17	—
Carbo animalis Norgine	35	25	33	23
Carbo medicinalis *Merck* „Neu“ .	20	—	19	—
Carbo animalis *Merck* 15107 . .	20	—	19	—

Wir haben diesen Versuch noch einigemal wiederholt und fanden niemals übereinstimmende Resultate.

Eine weit bessere Methode ist die von *Joachimoglu*[1]) angegebene Versuchsanordnung:

50 ccm einer 0,15 proz. Methylenblaulösung (wir benutzten Methylenblau medicin. Hoechst 95063), wurden mit 0,1 g Kohle während 30 Minuten geschüttelt und darauf zentrifugiert. Die Bestimmung des Methylenblaugehalts geschah kolorimetrisch (im Kolorimeter von *Autenrieth*).

Tabelle VII. Adsorption von Methylenblau.

Kohleart	0,15 proz. Methylenblau Proz. adsorbiert
Medizinal-Supra-Norit	84
Supra-Norit	73
Carbo animalis Norgine	75
Carbo medicinalis *Merck* „Neu“	60
Carbo animalis *Merck* 15017	50

Die Adsorption der bis zur Konstanz *getrockneten* obengenannten Kohlen betrug 86 bzw. 72, 83, 73 und 70 Proz.

Auch zeigte sich, daß bei dieser Methode das Maximum von Adsorption schon nach 2 Minuten Schütteln erreicht wird. In diesem Versuch benutzten wir die bei 120⁰ getrockneten Kohlen.

Tabelle VIII. Adsorption von Methylenblau.

Kohleart bei 120⁰ getrocknet	0,15 proz. Methylenblau Proz. adsorbiert — Minuten geschüttelt: 30	20	10	5	2	1
Medizinal-Supra-Norit	86	87,5	86	87,5	83	83
Supra-Norit	72	75,5	75	77,5	77,5	68
Carbo animalis Norgine	83	81,5	80	81	76,5	73
Carbo medicinalis *Merck* „Neu“ .	73	69,5	70	64	65	62,5
Carbo animalis *Merck* 15017 . .	70	65	65	69,5	66	66

[1]) Diese Zeitschr. 77, 1, 1916.

Die neue Kohle „Medizinal-Supra-Norit“ erweist sich also auch Methylenblau gegenüber am stärksten adsorbierend, dann folgt die Kohle Carbo animalis Norgine, die etwa gleich stark wie Supra-Norit adsorbiert; nach Trocknen ist — entsprechend dem höheren Wassergehalt der lufttrockenen Carbo animalis Norgine — diese stärker als Supra-Norit, aber erreicht auch dann noch nicht die der lufttrockenen Medizinal-Supra-Norit. Das Adsorptionsvermögen hiervon nimmt übrigens, wie nach dem geringen Wassergehalt zu erwarten, durch Trocknen kaum zu. Beide *Merck*sche Kohlen sind den genannten Kohlen unterlegen, und zwar die Carbo medicinalis „Neu“ weniger.

Wir sahen entsprechend früher geäußerten Meinungen nach, ob der *verschiedene Adsorptionsgrad* von drei der untersuchten Kohlen, Carbo animalis Norgine, Supra-Norit und Carbo medicinalis *Merck* „Neu“ mit dem verschiedenen Stickstoffgehalt etwas zu tun hat.

Wir bestimmten den N_2 nach *Kjeldahl* (Mikromethode) und nach *Dumas* (Mikromethode).

Tabelle IX.
Stickstoffgehalt der verschiedenen Kohlearten.

Kohleart	Bestimmung nach *Kjeldahl* (Mikromethode)		
	mg abgewogene Kohle	mg gefundener Stickstoff	Proz. Stickstoff
Supra-Norit	93,16	0,24	0,26
„ „	83,09	0,17	0,20
Carbo animalis Norgine	54,33	0,65	1,20
„ „ „	58,42	0,65	1,12
Carbo medicinalis *Merck* „Neu“	109,67	0,11	0,10
„ „ „ „	308,33	0,27	0,088

Bestimmung nach Mikro-*Dumas*.

Supra-Norit 70,07 mg Substanz gaben 0,11 ccm N_2 bei 19° und 750 mm = 0,18 Proz. Stickstoff.

Supra-Norit 87,28 mg Substanz gaben 0,12 ccm N_2 bei 18° und 750 mm = 0,15 Proz. Stickstoff.

Carbo anim. Norgine 55,63 mg Substanz gaben 0,598 ccm N_2 bei 19° und 750 mm = 1,22 Proz. Stickstoff.

Carbo anim. Norgine 74,60 mg Substanz gaben 0,75 ccm N_2 bei 19° und 759 mm = 1,16 Proz. Stickstoff.

Carbo Medizin. *Merck* „Neu“ 308,33 mg Substanz gaben 0,13 ccm N_2 bei 18° und 757 mm = 0,049 Proz. Stickstoff.

Carbo Medizin. *Merck* „Neu“ 183,54 mg Substanz gaben 0,09 ccm N_2 bei 18° und 757 mm = 0,056 Proz. Stickstoff.

Die kleinen Unterschiede zwischen den beiden Methoden werden wohl Analysenfehlern zuzuschreiben sein. Aus den beiden Methoden ist zu schließen, daß der Stickstoff in der Kohle nicht an Sauerstoff

gebunden oder in einem Ringsystem anwesend sein kann, da sonst die Werte nach *Kjeldahl* niedriger sein müßten.

Und was das für uns wesentliche betrifft, so ergibt sich, daß der Stickstoffgehalt der Kohle für die Stärke der Adsorption keine ausschlaggebende Rolle spielt. Dies hat auch schon *Friedrich*[1]) im Gegensatz zu den von ihm zitierten *Glassner* und *Suida* angegeben.

Die beiden ersten Kohlen zeigen einen großen Unterschied im Stickstoffgehalt, trotzdem ist das Adsorptionsvermögen wenig verschieden, während die erste und dritte Art Kohle bei fast gleichem Stickstoffgehalt einen großen Unterschied im Adsorptionsvermögen erkennen lassen.

Ob die *Reaktion* der Kohle einen großen Einfluß auf das Adsorptionsvermögen der Kohle hat, haben wir auf folgende Weise untersucht:

Durch 5 g der Supra-Noritkohle wurde etwa 6 Stunden getrocknetes Salzsäuregas geleitet. Darauf wurde so lange trockene Luft durchgeleitet, bis die Kohle geruchlos war. Von der Kohle wurde Salzsäure tatsächlich adsorbiert, und ein Teil wird leicht an Wasser abgegeben. Dies zeigte folgender Versuch:

Beim Schütteln von 1 g dieser Kohle mit 100 ccm Wasser wurden in der wässerigen Lösung 35 mg HCl gefunden.

Die Adsorptionsfähigkeit dieser mit Salzsäure vorbehandelten Kohle wurde mit unbehandelter Supra-Noritkohle verglichen.

Wir gebrauchten hier Morphium hydrochloricum an Stelle der oben untersuchten Stoffe. Auch in der ersten Mitteilung haben wir Morphium hydrochloricum benutzt (s. dort die nähere Methode der Bestimmung).

50 ccm einer 0,5proz. salzsauren Morphinlösung wurden mit wechselnden Mengen der beiden Kohlen geschüttelt. Im Filtrat wurde der Rückstand und der Aschegehalt bestimmt, und daraus die Adsorption des salzsauren Morphins berechnet.

Tabelle X.
Adsorption von salzsaurem Morphin.

Kohle	50 ccm 0,5proz. salzsaures Morphin	
	Mit Salzsäure vorbehandelte Supra-Noritkohle	Supra-Noritkohle
mg	Proz. adsorbiert	Proz. adsorbiert
250	23,45	45,85
500	50,0	71,7
750	67,2	81,0

[1]) Österr. chem. Zeitung 18, 130, 1915.

Aus dieser Tabelle zeigt sich, daß der Einfluß der sauren Reaktion auf die Adsorptionsfähigkeit in bezug auf ein Alkaloid ein sehr großer ist, und zwar wird diese durch Ansäuerung bedeutend herabgesetzt.

Leitet man dagegen auf dieselbe Weise, wie bei der Salzsäure angegeben, trockenes *Ammoniak*gas durch die Kohle, so werden nur Spuren von diesem Gas von der Kohle adsorbiert. Es zeigte sich daher auch, daß diese Weise von Vorbehandlung auf die Adsorptionsfähigkeit der Kohle keinen Einfluß ausübte.

Endlich untersuchten wir im Anschluß an die obigen Versuche mit Oxalsäure und an die Versuche in der ersten Mitteilung, wo außer Oxalsäure auch das saure Kaliumsalz der Oxalsäure untersucht wurde, wie sich das neutrale Salz der Oxalsäure verhält.

Es wurden 250, 500, 2500 und 5000 mg Kohle Supra-Norit und Medizinal-Supra-Norit mit je 50 ccm n/10 Natriumoxalat geschüttelt, wie früher angegeben. Im Filtrat wurde das Oxalat mit n/10 $KMnO_4$ in saurer Lösung bestimmt. Es zeigte sich, daß nur durch die größten Konzentrationen etwas adsorbiert wird.

Tabelle XI. Adsorption von Natriumoxalat.

Kohle mg	Medizinal Supra-Norit, adsorbiert Proz.	Supra-Norit, adsorbiert Proz.
250	0	0
500	0	0
2500	1,5	2,5
5000	—	5,5

Wurden zu der n/10 Lösung von Natriumoxalat 4 g Natriumhydroxyd pro Liter hinzugefügt, dann findet auch bei den größeren Kohlemengen keine Adsorption von Natriumoxalat statt, während eine Adsorption von Hydroxylionen erst bei Kohlemengen von 2500 mg auf 50 ccm Lösung nachgewiesen werden konnte. Die Adsorption betrug hierbei etwa 10 Proz.

Zum Schluß wurde dann noch die Adsorption eines zweiten Salzes an Supra-Norit bestimmt.

Die Adsorption von *Cyankalium* an der Supra-Noritkohle war ebenso wie die des Natriumoxalats eine sehr geringe.

250, 500 und 750 mg Kohle Supra-Norit wurden mit 50 ccm einer 1 proz. Cyankaliumlösung geschüttelt wie oben. Im Filtrat wurde das KCN mit 0,05 n $AgNO_3$ bestimmt.

Tabelle XII. Adsorption von Cyankalium.

Kohle Supra-Norit mg	1 proz. Cyankaliumlösung Proz. adsorbiert
250	1,45
500	3,07
750	3,27

Zusammenfassung.

1. Es wurden Kohlesorten: die Pflanzenkohlen Medizinal-Supra-Norit, Supra-Norit mit Tierkohlen Carbo medicinalis Norgine, Carbo animalis *Merck* und die Carbo medicinalis *Merck* „Neu" auf ihre Adsorptionsfähigkeit von Giften, Sublimat, Strychnin, Morphin, Oxalsäure und Methylenblau untersucht.

2. Die neue Kohle Medizinal-Supra-Norit wirkt in allen untersuchten Fällen am stärksten adsorbierend, und dies trotz eines höheren Gehaltes an Asche, als ihn die kürzlich untersuchte Supra-Norit hat.

3. Die Carbo animalis Norgine gehört ebenfalls zu den sehr gut adsorbierenden Kohlen, wenn sie auch, was die Adsorbierbarkeit von Giften anlangt, von der Supra-Noritkohle, im besonderen von Medizinal-Supra-Norit, übertroffen wird.

4. Die Carbo medicinalis *Merck* „Neu" adsorbiert in verschiedenen Fällen besser als die Carbo animalis *Merck* (ausgenommen bei der Adsorption von Strychninnitrat, steht aber in Adsorptionsfähigkeit hinter den vorhergenannten Kohlen zurück.

5. Strychninnitrat wird von Supra-Norit besser adsorbiert als salzsaures Morphin.

6. Die Methylenblaumethode zur Beurteilung der Adsorptionsfähigkeit einer Kohle ist in der Form, wie sie *Wiechowski* angibt, ungeeignet, dagegen hat sie in der Form, wie sie *Joachimoglu* beschreibt, orientierenden Wert.

7. Veränderung der Reaktion der Kohle nach der sauren Seite durch trockenes HCl ist sehr nachteilig für die Adsorption von Morph. hydrochlor.

8. Entsprechend den sonstigen Erfahrungen ist die Adsorption von neutralen Salzen, wie von Natriumoxalat und Kaliumcyanid, sehr gering.

Über das Verhältnis des menschlichen Nativserums zum Vollblutserum.

II. Mitteilung: Über das Wesen des auftretenden Brechungsunterschiedes.

Von

W. Starlinger und U. Strasser.

(Aus der II. medizinischen Universitätsklinik in Wien.)

(Eingegangen am 25. Mai 1925.)

I. Einleitung und Fragestellung.

Nachdem die bisher vorliegenden experimentellen Untersuchungen gezeigt hatten:

1. daß zwischen nativem Serum (NS, gewonnen durch Spontangerinnung nativen Plasmas) und Vollblutserum (VBS, gewonnen durch Spontangerinnung des Vollblutes) Brechungsunterschiede von wechselnder Größe auftreten [*Leendertz*[1]), *W. Starlinger*[2]), *v. Frey*[3]), *Gromelski*[4])];

2. daß diese Brechungsunterschiede regelmäßig (*Leendertz*, *Gromelski*) oder nur in einem Teile der Fälle (*W. Starlinger*, *v. Frey*) zur Beobachtung gelangen;

3. daß sie ausschließlich im Sinne eines höheren Brechungsvermögens des NS (*Leendertz*, *Gromelski*) oder *auch* im umgekehrten Sinne (*W. Starlinger*, *v. Frey*) zur Ausbildung kommen;

wurden in einer weiteren Mitteilung[5]) einerseits die vorstehenden eigenen Befunde vollinhaltlich bestätigt, andererseits zur Klärung des Wesens der Erscheinung Änderungen der Serumbestandteile sowohl in quantitativer Hinsicht (Konzentrationsverschiebung) als auch in qualitativer Hinsicht (Verschiebung der spezifischen Refraktion der Eiweißkörper) in Betracht gezogen.

---

[1]) *Leendertz*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **140**, 1922.
[2]) *W. Starlinger*, diese Zeitschr. **140**, 1923.
[3]) *v. Frey*, ebendaselbst **148**, 1924.
[4]) *Gromelski*, ebendaselbst **149**, 1924.
[5]) *W. Starlinger*, ebendaselbst **153**, 1924.

Da nun die sichergestellte Abhängigkeit der Vollrefraktion des Serums von der Art seiner Gewinnung, sei es als Folge quantitativer, sei es qualitativer Veränderungen seiner Bestandteile, sowohl in theoretischer Hinsicht (Wechselbeziehungen zwischen plasmatischem und zellulärem Blutanteil) als auch in praktischer Hinsicht (Maßanalyse einzelner Plasma-Serumbestandteile) Beachtung verlangen darf, schien der Versuch einer weiteren experimentellen Analyse auf Grund der im vorstehenden angeführten theoretischen Voraussetzungen berechtigt und begründet.

Die Durchführung der experimentellen Prüfung mußte den Anteil der verschiedenen Serumkomponenten an der Brechungsdifferenz der Vollseren zu ermitteln und die Größe der Ausschläge auf Grund kritischer Bewertung der jeweils in Betracht zu ziehenden technisch-methodisch bedingten $\pm$-Abweichung festzustellen trachten.

II. Häufigkeit, Ausschlagsrichtung und Ausmaß des Brechungsunterschiedes zwischen den Vollrefraktionen[1]) des NS und VBS.

Die Abweichung zwischen Kontrollbestimmungen sowohl des NS als auch des VBS *einer* Blutentnahme überschreitet das Ausmaß des technisch bedingten Ablesefehlers ($= \pm 0{,}5$ Skalenteile) nicht; als *sichere* Differenz zwischen den Vollrefraktionen des NS und VBS darf also jede Differenz über 0,1 Skalenteile angesehen werden.

Der neuerliche Vergleich der Vollrefraktionen des NS und VBS ergab im Rahmen gleicher Methodik (l. c.) in 28 Bestimmungen *einer* Serie, deren Vollrefraktionen 55,4 bis 65,7 Skalenteile betrugen:

zwölfmal eine Differenz im Sinne NS $>$ VBS im Ausmaß von (viermal) 0,1, (zweimal) 0,2, (zweimal) 0,4, (zweimal) 0,5, 0,6, 0,9 Skalenteilen (Sk.-T.);

zwölfmal im Sinne NS $<$ VBS im Ausmaß von: (fünfmal) 0,1, (zweimal) 0,2, 0,3, (dreimal) 0,4, 0,7 Sk.-T;

viermal keine Differenz.

Bei Einbeziehung der eigenen, früher mitgeteilten Resultate (l. c.) ergibt sich folgende Übersicht:

Brechungsunterschied in Sk.-T.:		0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,4
NS > VBS	37		12	2	3	3	5	4			2	1	
NS < VBS	37		7	7	4	8	3	3	2	2			1
NS = VBS	20	20											

In insgesamt 94 Versuchen kam also bei Berücksichtigung nur jener Differenzen, die das Ausmaß von 0,1 Sk.-T. überschreiten, in

[1]) Die Angabe der Refraktion erfolgt in diesem Abschnitt aus Gründen des Vergleichs mit früheren Arbeiten in *Pulfrich*schen Skalenteilen, in allen späteren Abschnitten in Einheiten des Brechungsindex.

55 Versuchen ein Brechungsunterschied zur Beobachtung, und zwar 25mal im Sinne NS $>$ VBS, 30mal im Sinne NS $<$ VBS: der größte Unterschied betrug im Sinne der ersten Ausschlagsrichtung 1,0, im Sinne der zweiten 1,4, der mittlere Unterschied 0,33 bzw. 0,38, der mittlere Gesamtunterschied 0,35 bzw. (unter Einbeziehung auch der differenzlosen Fälle) 0,28 Sk.-T.

Sichere Refraktionsdifferenzen zwischen NS und VBS scheinen also in ungefähr drei Fünfteln aller Fälle zur Ausbildung zu gelangen, ohne eine Ausschlagsrichtung deutlich zu bevorzugen und ohne ein Ausmaß von $n_D = 0{,}00060$ (= 1,5 Sk.-T.) zu überschreiten.

Nachdem solcherweise an großem Material (dem größten zur Fragestellung vorliegenden) hinreichender Aufschluß über das Verhalten des Brechungsunterschiedes zwischen den Vollrefraktionen gewonnen war, mußte geprüft werden, ob und in welchem Ausmaß beide Hauptgruppen der im Serum gelösten Stoffe: nicht koagulable und koagulable Körper an der Refraktionsdifferenz durch Änderungen des eigenen Brechungsvermögens Anteil nehmen.

III. Häufigkeit, Ausschlagsrichtung und Ausmaß des Brechungsunterschiedes zwischen den auf die nicht koagulablen Körper entfallenden Refraktionen (Restrefraktionen: RR) des NS und VBS.

Die RR wurde nach dem Prinzip *Robertons* bestimmt:

Serum und m/25 Essigsäure werden zu gleichen Teilen gemischt und gekocht, das gefällte Eiweiß wird entfernt, die Brechung der Restflüssigkeit bestimmt und darauf unter Berücksichtigung der Brechung m/50 Essigsäure und der stattgehabten Verdünnung die RR nach folgender Formel bestimmt: (Refraktion der Restflüssigkeit — Refraktion m/50 Essigsäure) $\times$ 2.

Die Methodik darf als einwandsfrei bezeichnet werden, die Differenz zwischen Kontrollbestimmungen beträgt im Mittel $n_D = 0{,}00006$, die mittlere $\pm$-Abweichung *einer* Bestimmung somit $n_D = \pm 0{,}00003$[1]).

Der Vergleich der RR des NS und VBS ergab in 22 Bestimmungen *einer* Serie, deren Brechungswerte $n_D = 0{,}00224$ bis 0,00375 betrugen:

sechsmal eine Differenz im Sinne: NS $>$ VBS im Ausmaß von: n_D = (zweimal) 0,00004, 0,00008, 0,00012, 0,00014, 0,00032;

viermal eine Differenz im Sinne: NS $<$ VBS im Ausmaß von: n_D = 0,00008, 0,00016, 0,00028, 0,00038;

zwölfmal keine Differenz.

Es kam also in 22 Bestimmungen achtmal ein Brechungsunterschied von größerem Ausmaß als dem der doppelten $\pm$-Abweichung zur Beobachtung, viermal im Sinne: NS $>$ VBS, viermal im Sinne: NS $<$ VBS; der größte Unterschied betrug im Sinne der ersten Aus-

[1]) *W. Starlinger* und *K. Hartl*, diese Zeitschr., im Erscheinen.

schlagsrichtung $n_D = 0{,}00032$, im Sinne der zweiten $n_D = 0{,}00038$, der mittlere Unterschied $n_D = 0{,}00012$ bzw. 0,00023, der mittlere Gesamtunterschied $n_D = 0{,}00017$ bzw. (bei Einbeziehung auch der differenzlosen Fälle) $n_D = 0{,}00007$.

IV. Häufigkeit, Ausschlagsrichtung und Ausmaß des Brechungsunterschiedes zwischen den auf die koagulablen Körper entfallenden Refraktionen (Eiweißrefraktionen: ER) des NS und VBS.

Der Wert der ER ergibt sich im Rahmen der Differenzrechnung aus der Vollrefraktion durch Abzug der RR und der Wasserrefraktion ($n_D = 1{,}33320$), ist also hinsichtlich der Fehlermöglichkeit von der Fehlabweichung der Bestimmung sowohl der Vollrefraktion als auch der RR abhängig; da die mittlere Fehlabweichung der Bestimmung des ersten Wertes nach obigem mit $n_D = \pm 0{,}00002$, des zweiten Wertes mit $n_D = \pm 0{,}00003$ festgesetzt werden kann, beträgt die mittlere Fehlabweichung der Bestimmung der ER $n_D = \pm 0{,}00005$.

Der Vergleich der ER des NS und VBS ergab in 23 Bestimmungen einer Serie, deren Brechungswerte $n_D = 0{,}01253$ bis 0,01561 betrugen:

sechsmal eine Differenz im Sinne: NS > VBS im Ausmaß von: $n_D = 0{,}00004$, 0,00005, 0,00014, 0,00031, 0,00032, 0,00033;

zwölfmal im Sinne: NS < VBS im Ausmaß von: $n_D =$ (zweimal) 0,00004, 0,00007, 0,00008, 0,00009, 0,00010, 0,00014, 0,00021, 0,00026, 0,00039, 0,00047;

fünfmal keine Differenz.

Es kam also in 23 Bestimmungen neunmal ein Brechungsunterschied von größerem Ausmaß als dem der doppelten mittleren Fehlabweichung der Bestimmung zur Beobachtung, viermal im Sinne NS > VBS, fünfmal im Sinne NS < VBS; der größte Unterschied betrug im Sinne der ersten Ausschlagsrichtung $n_D = 0{,}00033$, im Sinne der zweiten $n_D = 0{,}00047$, der mittlere Brechungsunterschied $n_D = 0{,}00023$ bzw. 0,00017, der mittlere Gesamtunterschied 0,00019 bzw. (bei Einbeziehung der differenzlosen Fälle) $n_D = 0{,}00013$.

Nachdem solcherweise festgestellt war, daß sowohl nichtkoagulable Körper (RR) wie koagulable Körper an der Ausbildung der Gesamtrefraktionsdifferenz Anteil nehmen, mußten die Beziehungen zwischen beiden Gruppen im Einzelfall der experimentellen Prüfung zugeführt werden.

V. Die Beziehungen zwischen den auf RR und ER entfallenden Anteilen des Gesamtbrechungsunterschiedes zwischen NS und VBS.

In 23 Bestimmungen *einer* Serie ergab sich folgende Zusammensetzung der Differenz zwischen den Vollrefraktionen des NS und VBS aus den Teilrefraktionen der RR und ER.

Zum Verständnis der Tabelle sei bemerkt, daß Differenzen der Brechungswerte im Sinne NS > VBS durch das Vorzeichen — (sinkend), im Sinne NS < VBS durch das Vorzeichen + (steigend) gekennzeichnet sind.

Nr.	Differenz der Vollrefraktion $n_D = 0{,}000$	Differenz der RR $n_D = 0{,}000$	Differenz der ER $n_D = 0{,}000$	Nr.	Differenz der Vollrefraktion $n_D = 0{,}000$	Differenz der RR $n_D = 0{,}000$	Differenz der ER $n_D = 0{,}000$
1	— 36	00	— 36	13	00	00	00
2	— 24	08	— 32	14	00	00	00
3	— 20	— 26	+ 06	15	+ 04	00	+ 04
4	— 16	+ 46	— 62	16	+ 04	00	+ 04
5	— 16	00	— 16	17	+ 04	00	+ 04
6	— 08	— 04	— 04	18	+ 08	00	+ 08
7	— 04	+ 38	— 42	19	+ 08	00	+ 08
8	— 04	+ 28	— 32	20	+ 12	00	+ 12
9	— 04	— 14	+ 10	21	+ 16	— 08	+ 24
10	— 04	00	— 04	22	+ 16	— 32	+ 48
11	00	+ 16	— 16	23	+ 28	00	+ 28
12	00	— 04	+ 04				

Unter Vernachlässigung aller Differenzen unter der mittleren Fehlabweichung (n_D = 0,00006 für RR, n_D = 0,00010 für ER) ergaben sich also:

siebenmal Brechungsunterschiede beider Refraktionsanteile;

zehnmal Brechungsunterschiede keines Refraktionsanteils;

sechsmal Brechungsunterschiede nur eines Refraktionsanteils, und zwar viermal allein der ER und zweimal allein der RR.

Hinsichtlich der Ausschlagsrichtung bewegten sich die Brechungsunterschiede der beiden Refraktionsanteile in allen sieben Fällen der ersten Gruppe in verschiedener Richtung, und zwar ohne Bevorzugung eines Refraktionsanteils.

Hinsichtlich des Ausmaßes des Brechungsunterschiedes übertraf die ER bei lediglicher Berücksichtigung von Differenzen über n_D = 0,00016 die RR viermal; dreimal war das Ausmaß für beide Refraktionsanteile dasselbe.

Eine Differenz zwischen den Vollrefraktionen kam also bei Berücksichtigung nur jener Brechungsunterschiede, deren Ausmaß 0,1 Sk.-T. (n_D = 0,00004) übertraf, zustande:

Im Sinne der Ausschlagsrichtung NS > VBS (Protokolle 1 bis 6) infolge alleinigen Absinkens der ER (zweimal), infolge stärkeren Absinkens der ER als Ansteigens der RR (zweimal), infolge Absinkens beider Teilrefraktionen (einmal), infolge stärkeren Absinkens der RR als der ER (einmal);

im Sinne der Ausschlagsrichtung NS < VBS (Protokolle 18 bis 23) infolge Ansteigens der ER allein (dreimal), infolge stärkeren Ansteigens der ER als Absinkens der RR (zweimal);

umgekehrt wurden in den Versuchen, welche keine Differenz der Vollrefraktionen aufwiesen (Protokolle 7 bis 17), ausgeprägte, jedoch wechselweise zum Ausgleich gelangende Brechungsunterschiede beider Refraktionsanteile beobachtet (viermal).

Das Ergebnis der refraktometrischen Analyse des Wesens der Refraktionsdifferenz zwischen NS und VBS darf also folgendermaßen zusammengefaßt werden:

An der Ausbildung der Differenz zwischen den Vollrefraktionen können Refraktionsverschiebungen sowohl der nicht koagulablen Körper, als auch der koagulablen Körper teilhaben (als welch letztere vor allem die Eiweißkörper in Betracht zu ziehen sind); diese in jeder Ausschlagsrichtung vorhandenen Refraktionsverschiebungen bewegen sich, zueinander in Vergleich gebracht, sowohl im gleichen wie entgegengesetzten Sinne, so daß in letzterem Falle in der Differenz der Vollrefraktionen lediglich der nicht wechselseitig kompensierte Anteil der Refraktionsverschiebungen der Teilrefraktionen zum Ausdruck kommt, während bei völligem Ausgleich selbst ausgeprägte Refraktionsverschiebungen der Teilrefraktionen in einer Differenz der Vollrefraktionen nicht manifest werden; in manchen Fällen kommt es zum Brechungsunterschied der Vollrefraktionen lediglich auf Grund einer Refraktionsverschiebung der koagulablen (Eiweiß-)Körpergruppe; fast ausnahmslos übertrifft das Ausmaß der Refraktionsverschiebung innerhalb dieser Gruppe das Ausmaß der Refraktionsverschiebung der nichtkoagulablen Körpergruppe.

Daraus ergeben sich folgende Feststellungen und Schlüsse:

Die Refraktionsschwankungen der nicht koagulablen Körpergruppe müssen auf Konzentrationsänderungen bezogen werden, da Änderungen der spezifischen Reaktion nicht in Frage kommen.

Die Refraktionsschwankungen der koagulablen (Eiweiß-)Körpergruppe können a priori sowohl auf Konzentrationsänderungen als auch Verschiebungen der spezifischen Refraktion beruhen: Da nun einerseits konzentrationsändernde Einwirkungen auf beide Gruppen im allgemeinen gleiche, zumindest nicht entgegengesetzte Einflußnahme ausüben können, andererseits aber ausgeprägt entgegengerichtete Verschiebungen (und zwar im vorliegenden Versuchsmaterial ausschließlich) beobachtet wurden, scheint die Annahme, daß den Refraktionsverschiebungen der koagulablen Körpergruppe neben Konzentrationsänderungen auch strukturelle Änderungen zugrunde liegen, am ehesten begründet.

Zur experimentellen Sicherung dieser Annahme wurde die direkte Maßanalyse, bzw. im Rahmen des Vergleichs maßanalytischer und refraktometrischer Ergebnisse die direkte Bestimmung der spezifischen Refraktion herangezogen, trotzdem von vornherein in Anbetracht des

Mißverhältnisses zwischen Ausmaß der möglichen Ausschläge und Größe der technisch-methodisch bedingten Fehlabweichung der maßanalytischen Bestimmung ein eindeutiges Ergebnis auf diesem Wege kaum erwartet werden konnte.

VI. Die maßanalytisch feststellbaren Unterschiede zwischen dem Eiweißgehalt des NS und VBS.

Die maßanalytische Bestimmung der Gesamteiweißkörper gestaltete sich gravimetrisch in folgender Weise:

0,5 ccm Serum werden mit einigen Kubikzentimetern Wasser, mit gleicher Menge m/25 Essigsäure und wenigen Tropfen gesättigter Am_2SO_4-Lösung versetzt, gekocht, durch vorgewogene Schleicher-Schüll(Blauband)-Filter geschickt, mit destilliertem Wasser bis zum Verschwinden der Sulfatreaktion ($BaCl_2$) nachgewaschen, mit Alkoholäther gespült, im Trockenschrank getrocknet und gewogen.

Die mittlere Fehlabweichung der Methodik beträgt $\pm$ 0,12 g-Proz. (l. c.), darf jedoch im Rahmen der vorliegenden Untersuchungsreihe eher geringer veranschlagt werden, da jeder verwendete Wert als Mittelwert aus je zwei Kontrollbestimmungen erhalten wurde.

Der solcherweise durchgeführte Vergleich des Gesamteiweißgehaltes von NS und VBS ergab in 22 Bestimmungen *einer* Serie, deren Werte 5,9 bis 8,2 g-Proz. betrugen:

Fünfmal eine Differenz im Sinne NS $>$ VBS im Ausmaß von 0,1, 0,2 (dreimal), 0,3 g-Proz.;

zwölfmal eine Differenz im Sinne NS $<$ VBS im Ausmaß von 0,1 (zweimal), 0,2 (viermal), 0,3 (fünfmal), 0,4 g-Proz.;

fünfmal keine Differenz.

Es kam also in 23 Bestimmungen siebenmal ein Unterschied des Gesamteiweißgehaltes von größerem Ausmaß als dem der doppelten Fehlabweichung der Bestimmung zur Beobachtung, und zwar einmal im Sinne NS $>$ VBS, sechsmal im Sinne NS $>$ VBS; der größte Unterschied betrug im Rahmen der ersten Gruppe 0,3 g-Proz., im Rahmen der zweiten Gruppe 0,4 g-Proz., der mittlere Unterschied 0,22 bzw. 0,24 g-Proz., der mittlere Gesamtunterschied 0,23 bzw. (bei Einbeziehung der differenzlosen Fälle) 0,18 g-Proz.

Sichere Unterschiede der Eiweißkonzentration konnten also mit Hilfe gravimetrischer Maßanalyse nicht festgestellt werden.

In der Literatur liegen ähnliche Untersuchungen von seiten *v. Freys* vor, der auf kjeldahlometrischem Wege die Eiweißkonzentrationen des NS und VBS verglich; er fand in 25 Bestimmungen achtmal Differenzen im Sinne NS $>$ VBS, zwölfmal Differenzen im Sinne NS $<$ VBS, fünfmal keine Differenz; der größte Unterschied erreichte in der ersten Gruppe das Ausmaß von 0,74, in der zweiten Gruppe das Ausmaß von 0,81, der mittlere Unterschied betrug 0,20 bzw. 0,27 g-Proz., der mittlere Gesamtunterschied 0,24 bzw. (bei Einbeziehung der differenzlosen Fälle) 0,19 g-Proz.

Da über das Ausmaß der Fehlabweichung der Bestimmung keine Angabe gemacht wird, kann eine einwandfreie kritische Bewertung dieser Befunde nicht durchgeführt werden.

VII. Der feststellbare Unterschied zwischen den spezifischen Refraktionen der Eiweißkörper des NS und VBS.

Als spezifische Refraktion von Eiweißkörpern wird die Refraktion in 1proz. wässeriger Lösung bezeichnet und ihr Wert demgemäß aus dem Verhältnis der Eiweißrefraktion zur Eiweißkonzentration errechnet. Das Ausmaß der Fehlabweichung ihrer Bestimmung summiert sich daher aus den Fehlabweichungen der Bestimmung beider Faktoren und beträgt demzufolge $n_D = \pm 0{,}00005$. (Genaue Ableitung s. *W. Starlinger* und *K. Hartl*, l. c.)

Der Vergleich der spezifischen Refraktionen der Eiweißkörper des NS und VBS ergab in 19 Bestimmungen, deren Werte $n_D = 0{,}00186$ bis 0,00219 betrugen:

13mal eine Differenz im Sinne NS > VBS im Ausmaß von $n_D = 0{,}00001$, 0,00002, 0,00003 (zweimal), 0,00005, 0,00007 (viermal), 0,00009, 0,00010, 0,00014, 0,00019;

viermal im Sinne NS < VBS im Ausmaß von $n_D = 0{,}00001$, 0,00004 (zweimal), 0,00013;

zweimal keine Differenz.

Es kam also in 19 Bestimmungen dreimal eine Differenz von größerem Ausmaß als dem der doppelten mittleren Fehlabweichung zur Beobachtung, und zwar zweimal im Sinne NS > VBS, einmal im Sinne NS < VBS; die größte Differenz betrug in der ersten Gruppe $n_D = 0{,}00019$, in der zweiten Gruppe $n_D = 0{,}00013$, die mittlere Differenz betrug $n_D = 0{,}00007$ bzw. $n_D = 0{,}0006$, die mittlere Gesamtdifferenz $n_D = 0{,}00007$ bzw. (bei Einbeziehung der differenzlosen Fälle) $n_D = 0{,}00006$.

Sichere Unterschiede der spezifischen Refraktion der Eiweißkörper konnten also ebenfalls nicht festgestellt werden.

Da somit die nachgewiesenen Unterschiede der Konzentration und spezifischen Refraktion der Eiweißkörper die technisch-methodisch bedingte Fehlabweichung ihrer Bestimmung nicht genügend überboten, konnte die unmittelbare experimentelle Bestätigung der im vorigen ausgeführten Ableitung nicht erbracht werden; doch sei nochmals betont: einerseits, daß aus diesem Ergebnis der Schluß auf tatsächliches Nichtbestehen solcher Veränderungen in Anbetracht des schon hervorgehobenen Mißverhältnisses zwischen Ausmaß der Ausschlagsschwankung und Größe der Fehlbestimmung nicht gezogen werden darf, andererseits, daß die refraktometrische Analyse allein genügende Anhaltspunkte für die Beurteilung im bejahenden Sinne zu geben vermag.

Was nun die ursächliche Bedingtheit dieser solcherweise sichergestellten Veränderungen der nicht koagulablen und koagulablen Serumkörper bei Ablauf des Gerinnungsmechanismus und Anwesenheit des zellulären (roten) Blutanteils anlangt, so kann einstweilen lediglich das völlige Fehlen eines begründeten, in dieser Richtung zielenden Erklärungsversuchs festgestellt werden.

Denn die Annahme *v. Freys*, daß die Ausbildung des Brechungsunterschiedes von der Einwirkung der Luftkohlensäure abhängig sei, scheint in den eigenen Versuchsprotokollen des Autors keine genügende Stütze zu finden, da der supponierte Unterschied zwischen den Ergebnissen der mit und ohne Luftabschluß durchgeführten Versuchsreihe nicht besteht: indem einem größten Brechungsunterschied der Versuchsreihe ohne Luftabschluß von 2,1 und mittleren Unterschied (unter Einreihung der differenzlosen Fälle) von 0,75 Skalenteilen ein größter Unterschied von 2,0 und mittlerer Unterschied von 0,6 Skalenteilen im Rahmen der anderen Gruppe gegenüberstehen; überdies besteht ein zu großes Mißverhältnis der Größe des Versuchsmaterials beider einander gegenübergestellter Gruppen (19 Versuche ohne, 6 mit Luftabschluß), daß in Anbetracht des an sich häufigen Fehlens eines Brechungsunterschiedes selbst ein tatsächliches Vorkommen seltenerer und kleinerer Differenzen im Rahmen der zweiten, um so viel kleineren Versuchsreihe keine einwandsfreie Schlußfolgerung im Sinne des Autors zulassen würde. Schließlich kommen die Brechungsdifferenzen nachgewiesenermaßen bei völliger Luftausschaltung zur Ausbildung, wie auch *Leendertz*[1]) auf Grund seines eigenen Versuchsmaterials feststellen konnte. Die Annahme *v. Freys* darf demnach berechtigterweise abgelehnt werden.

Über eigene Untersuchungen in solcher Richtung wird später berichtet werden.

---

[1]) *Leendertz*, diese Zeitschr. **150**, 1924.

Der Einfluß von Änderungen im Kochsalz- und Wassergehalt der Kost auf das Blut und den Flüssigkeits- und Salzaustausch zwischen Gewebe und Blut.

Von

Kantaro Onohara (Osaka).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 26. Mai 1925.)

Immer mehr ist in neuerer Zeit das Interesse für den Mineral- und Wasserhaushalt des Organismus erwacht. Man sucht nicht mehr nur Vorstellungen über den Gehalt des Organismus an bestimmten Salzen und am Wasser zu gewinnen oder in Bilanzversuchen etwas über das Verhältnis von Zufuhr und Ausfuhr zu erfahren, vielmehr gehen wichtige Bestrebungen darauf aus, die besonderen Aufgaben dieser unter dem gemeinsamen Begriff der Elektrolyte zusammenzufassenden Stoffe im Organismus zu erfahren. Nun gelingt es unschwer, durch geeignete Änderungen der Kost wesentliche Abweichungen im Wasser- und Salzhaushalt eines Menschen oder Tieres herbeizuführen. Wie verhalten sich Blut und Gewebe, und wie die den Stoffwechsel begleitenden Reaktionen, wenn man die eben erwähnte Änderung des Stoffhaushaltes herbeigeführt hat? Zur Beantwortung dieser Fragen soll hier ein experimenteller Beitrag geliefert werden.

Ich übergehe die große Literatur über den Kochsalz- und Wasserhaushalt. Die hier mitgeteilten Versuche schließen sich eng an eine bestimmte Forschungsrichtung sowie an Arbeiten an, die einerseits den Stofftransport, andererseits die Rolle der Elektrolyte bei diesem Stofftransport genauer zu ermitteln bestrebt sind. Von klinischer Seite aus hat *Arnoldi*[1]) diese Richtung namentlich zur Erforschung des normalen wie gestörten Stoffwechsels in den letzten Jahren eingeschlagen. In einer Arbeit über den Einfluß des Salz- und Wassergehaltes der Kost auf den Cl-Gehalt des Blutserums versucht er mit

---

[1]) Zeitschr. f. exper. Path. u. Ther. **21**, **7.** Heft **1921.**

einer noch umständlichen, makrochemischen Methode Aufschluß über die Beziehungen der Nahrung zur Blutzusammensetzung zu gewinnen. Er findet im prozentualen Chlorgehalt des Serums bei kochsalzarmer Kost eine Tendenz zur Erhöhung, bei kochsalzreicher, wasserarmer Kost eine solche zur Herabsetzung und wiederum bei kochsalzreicher, wasserreicher Kost eine solche zur Erhöhung. Durch die mikrochemischen Methoden lassen sich die notwendigen Bestimmungen im Blute viel einfacher und öfter hintereinander ausführen. Es sei schon hier hervorgehoben, daß auch ich beim Hunde nach einer Periode der kochsalzarmen Kost, zumal wenn sie gleichzeitig auch wasserarm war, eine Erhöhung des Blutkochsalzgehaltes fand. Nach kochsalzreicher Ernährung (sie wurde beim Hunde nicht außerdem noch wasserreich und wasserarm durchgeführt, sondern bei freigewählter Wasseraufnahme) folgte eine ganz geringe Senkung des prozentualen Kochsalzgehaltes des Blutes. Wichtiger noch als diese Feststellungen sind Untersuchungen über im Blute nachweisliche Reaktionen am Ende einer jeden Kostperiode. Auch darüber möchte ich noch einige Vorbemerkungen machen. Schon geringe Nahrungsmengen rufen bei Menschen in den folgenden Stunden Änderungen in der Zusammensetzung des Blutes hervor, die man unter anderem auf den Einstrom von Flüssigkeit aus den Geweben zum Blute bzw. in umgekehrter Richtung beziehen kann. Um derartige Vorgänge handelt es sich auch bei meinen Versuchen, wenn ich vor und nach einer Fleischmahlzeit Trockensubstanz und NaCl-Gehalt des Blutes bestimmte.

In einer besonderen Rubrik wird der Blutkochsalzgehalt auf die Trockensubstanz des Blutes umgerechnet und angeführt. Die Differenz, gleich 100 Trockensubstanz in Prozenten, entspricht dem Wassergehalt des Blutes. Einer minderen Trockensubstanz entspricht also ein hoher Wassergehalt und umgekehrt. Finden wir eine Verminderung der Trockensubstanz und eine Erhöhung des auf Trockensubstanz umgerechneten NaCl-Wertes, so besagt dieser Befund, daß in das Blut eine kochsalzreiche Flüssigkeit einströmte (und zwar vom Gewebe aus, falls nicht in den Magen-Darmkanal NaCl eingeführt wurde). Alle weiteren Einzelheiten ergeben sich aus den folgenden Darlegungen.

Eigene Untersuchungen.

Alle Untersuchungen werden an einem Hunde vorgenommen, der in den einzelnen Versuchsperioden eine verschiedene Ernährung erhält. Am Ende jeder dieser Perioden wird der Einfluß einer Fleischmahlzeit auf den *Trockensubstanzgehalt des Blutes, den Prozentgehalt des Blutes an NaCl* sowie auf die auf den *Trockensubstanzgehalt des Blutes umgerechnete Kochsalzmenge des Blutes* in *dreistündigen Ver-*

suchen (jeweils halbstündige Bestimmungen) geprüft. Daneben sind fortlaufend Körpergewicht, Urinmenge, NaCl-Prozente und die gesamte NaCl-Menge des Harns bestimmt worden.

Als Kontrolle wird der Dreistundenversuch *ohne* Fleischzufuhr zunächst an dem normal ernährten, nüchternen Hunde vorgenommen. Dabei ist ein *geringer* Anstieg der Trockensubstanz, des Kochsalzprozentgehaltes des Blutes, weniger jedoch der auf die Trockensubstanz umgerechneten Kochsalzmenge festzustellen.

Es folgt nunmehr in der *ersten Periode* eine salz- und wasserreiche, sowie auch eiweißreiche Kost in einem Zeitraum von 9 Tagen. Der Hund säuft bei freier Wasseraufnahme etwa einen halben Liter Wasser pro die, nimmt über 700 g an Gewicht zu, hat eine Harntagesmenge von 400 bis 700 ccm und eine Kochsalzausscheidung mit dem Harn in diesem von 11 g bei einem Kochsalzprozentgehalt von etwa 2 Proz. des Harnes. Wir können annehmen, daß am Ende der ersten Periode der gesamte Salz- und Wassergehalt des Tieres höher lag als zuvor. Im Blute ist dagegen weder der Wasser- noch der NaCl-Gehalt angestiegen, dennoch mußten diese beiden Nahrungskomponenten vor allem in den Geweben aufgestapelt worden sein. Nun wird die dreistündige Probe mit halbstündigen Untersuchungen des Blutes im Anschluß an eine Fütterung mit 1 Pfund Fleisch vorgenommen.

Der salz-, wasser-, eiweißreiche Hund reagiert auf diese Fleischfütterung in den nächsten 3 Stunden derart:

> Starkes Absinken des Trockensubstanzgehaltes des Blutes, Anstieg der NaCl-Prozente und der auf den Trockensubstanzgehalt umgerechneten Kochsalzmenge des Blutes.

Offenbar strömte im Anschluß an die Fleischmahlzeit eine kochsalz- und wasserreiche Gewebsflüssigkeit bei dem salz-, wasser- und eiweißreichen Hundeorganismus in die Blutbahn. An sich sind die Änderungen des Blutes nach der Fleischmahlzeit am Ende der ersten Periode denen ähnlich, die ohne Fleischzufuhr am normal ernährten Tiere in einer Vorperiode beobachtet worden waren, die Abweichungen sind nur stärker ausgeprägt.

In einer *zweiten Periode* frißt der Hund nur 2 Tage lang das Fleisch restlos auf. Er erhält *kein* Kochsalz, dagegen Wasser nach Belieben. Bei dieser kochsalzarmen Kost werden Fleischaufnahme, Wasseraufnahme und Harnmenge entschieden geringer. Am siebenten Tage wird sogar die Nahrungsaufnahme verweigert, bis dahin hatte der Hund bereits 400 g Körpergewicht eingebüßt. Der Prozent- und Gesamtgehalt des Harnes an Kochsalz sinkt sehr deutlich ab, schließlich werden am sechsten und siebenten Tage Durchfälle vermerkt. Am achten Tage folgt die Fleischgabe, diesmal mit 350 g Fleisch. Die Trockensubstanz

des Blutes ist von Anfang deutlich gegenüber den früheren Feststellungen vermindert, der Blutwassergehalt dennoch vermehrt und gleichzeitig der auf die Trockensubstanz umgerechnete Kochsalzgehalt des Blutes erhöht. Die geschilderte Ernährung hat vorwiegend zu einem Wasserverlust des gesamten Organismus, aber gleichzeitig zu einer Vermehrung des Blutwassergehaltes geführt, während der Kochsalzgehalt des Blutes gleich bleibt oder sogar relativ ein wenig höher liegt. Das Blut ist also wasserreicher und kochsalzreicher, der Gesamtorganismus dagegen wahrscheinlich wasserärmer geworden. Das Blut ändert seinen Trocken- und Kochsalzgehalt während der dreistündigen Fleischperiode am achten Tage dieser Periode im gleichen Sinne wie in den beiden vorausgegangenen Versuchen. Bei dieser Reaktion strömt diesmal jedoch *weniger Wasser und relativ viel Kochsalz aus den Geweben in die Blutbahn.*

In der *dritten Periode* werden 3 Tage lang nur 50 ccm Wasser verabfolgt. Die Kost ist eiweißreich, salzarm, wasserarm. Das Körpergewicht sinkt um weitere 350 g. Der NaCl-Prozentgehalt des Harnes ist wiederum auf etwa 2 Proz. gestiegen, die Harnkochsalzausscheidung jedoch bleibt im ganzen genommen fast gleich hoch. Am vierten Tage folgt der Versuch mit 1 Pfund Fleisch. Der Blutkochsalzgehalt liegt vom Anfang an höher als in allen vorausgegangenen Bestimmungen. Bei vermehrtem Wassergehalt des Blutes hat der Gesamtorganismus wohl auch jetzt noch an Wasser verloren, viel weniger jedoch an Kochsalz. Der Blutkochsalzgehalt des Blutes ist sogar gestiegen. Diesmal sind indessen die Änderungen nach Fleischzufuhr geringer. Der Wasser- und *Kochsalzeinstrom aus den Geweben in das Blut sind nach der Fleischnahrung jetzt kaum stärker als bei der Drei-Stunden-Probe ohne Fleischzufuhr im Nüchternversuch der Vorperiode.*

Endlich sollte in einer vierten Periode an 3 Tagen nochmals viel Fleisch, Wasser und Salz gegeben werden. Der Hund säuft sehr reichlich Wasser (bis zu 850 ccm!!), läßt jedoch auch gleichzeitig viel mehr Urin als in der ersten Periode, in der die Fütterung die gleiche war. Die Nieren sondern einen prozentual kochsalzärmeren, wasserreicheren Urin ab bei hoher Gesamtkochsalzabgabe. Das Körpergewicht steigt nur um etwa 200 g an. Sicher war der *Ausgleich noch keineswegs abgeschlossen,* als am vierten Tage die Probe vorgenommen wird. Das Blut enthält auch jetzt noch viel Wasser und Kochsalz. *Nach* 1 *Pfund Fleisch strömt dem Blute aus den Geweben noch immer viel Kochsalz, dagegen weniger Wasser aus den Geweben zu.*

Da bei allen Drei-Stunden-Versuchen bereits vor der Fütterung Blutentnahmen vorgenommen werden, waren wir demnach in der Lage, den Einfluß der Koständerung auf das Blut im Nüchternzustande festzustellen.

Zusammenfassung.

Im Zustand des *salz- und wasserreichen Organismus* sinkt der Kochsalzprozentgehalt des Blutes bei unserem Versuchshund ein wenig ab. Nach *Entziehung des Kochsalzes* steigt NaCl-Prozent im Blute ein wenig an, nach *Entziehung von Kochsalz und Wasser* ist dieser Anstieg recht deutlich. Außerdem wird das Blut in den beiden letzteren Fällen wasserreicher.

Vermutlich liegen also die Verhältnisse derart, daß ein salz- und wasserreicher Organismus vor allem in den Geweben mehr Salz und Wasser aufstapelt und daher an Gewicht stark zunimmt. Das Blut kann dabei in seinem Wasser- und Salzgehalt fast unverändert bleiben. Nach Entziehung von Kochsalz oder gar von Kochsalz und Wasser dürften vor allem die Gewebe ihren Wasservorrat vermindern, daher sinkt das Gewicht wieder schnell ab. Das Blut enthält jedoch mehr Wasser und insbesondere mehr Kochsalz. *Blut und Gewebe ändern ihren Wasser- und Kochsalzgehalt jeweilig im entgegengesetzten Sinne.*

Schon bei normaler Ernährung kommt es im Laufe dreistündiger Nüchternheit zu einem Einströmen von Wasser und Kochsalz in die Blutbahn. So wenigstens fassen wir die gefundenen Änderungen des Blutes auf, indem wir den Einfluß einer abweichenden Diurese einmal außer Betracht lassen. Der Einstrom von Wasser und Kochsalz aus dem Gewebe in das Blut ist stärker, wenn einem salz-, wasser- und eiweißfreien Organismus eine größere Fleischmahlzeit zugeführt wird. Hat jedoch der Organismus an seinem Kochsalz- und Wasserbestand eingebüßt, überwiegt der Kochsalzeinstrom ins Blut bei der Fleischprobe. Ist der Wasservorrat weiter vermindert, sind die Änderungen im Blute sehr gering.

Es wird demnach der Nachweis erbracht, daß, wie es *Arnoldi* feststellte, durch Änderung des Salz- und Wassergehaltes der Kost eine Änderung des Wasser- und Kochsalzgehaltes des Blutes (und Gewebes) herbeigeführt wird. Weiterhin wird gezeigt, daß bei dem wasser- und salzreichen Organismus nach einer Fleischmahlzeit vom Gewebe zum Blute ein stärkerer Flüssigkeitseinstrom folgt, als im gleichen Versuch bei einem Organismus, dem nur wenig Kochsalz und Wasser in den vorausgehenden Tagen verabfolgt wurde. Die hier beschriebene Versuchsanordnung kann dazu dienen, die Reaktionen im Organismus unter durchaus verschiedenen Verhältnissen seines Salz-, Wasser- und (Eiweiß-?) Bestandes zu untersuchen.

Untersuchungsbelege.

Alle Versuche sind an einem 2 Jahre alten, 8 kg schweren weiblichen Hunde vorgenommen.

Die Grundkost bestand aus einem Pfunde gehacktem Pferdefleisch täglich. Dazu wurde Kochsalz und Wasser in verschiedenen Mengen gereicht.

Tabelle I.

Nr. Blutuntersuchung	Datum	Versuchstage	Körpergewicht g	Fütterung mit: Fleisch g	NaCl g	H_2O ccm	Harn: Tagesmenge ccm	NaCl-Gehalt Proz.	Gesamtmenge d. NaCl g
Vorperiode	11. XI.	1	8,130	500	—	128	400	1,82	7,28
	12. XI.	2	8,200	500	6,0	500	360	2,31	8,31
	13. XI.	3	8,570	500	6,0	600	600	2,04	12,24
	14. XI.	4		500	6,0	430	700	1,97	13,79
	15. XI.	5	8,750	500	6,0	410	530	1,89	10,01
	16. XI.	6		500	6,0	490	600	2,20	13,20
	17. XI.	7	8,590	500	6,0	600	625	2,07	12,94
	18. XI.	8		500	6,0	565	630	1,85	11,65
	19. XI.	9	8,890	500	6,0	300	345	2,13	7,34
1	20. XI.	10	9,000	500	—	235	292	1,59	4,64
	21. XI.	11		500	—	350	590	1,35	7,96
	22. XI.	12	9,000	350	—	500	600	1,07	6,46
	23. XI.	13		200	—	170	190	1,05	1,99
	24. XI.	14	8,600	300	—	250	325	1,11	3,60
	25. XI.	15		250	—	130	225	1,26	4,09
	26. XI.	16	8,600	—	—	200	90	0,79	0,71
	27. XI.	17		30	—	165	?	?	?
2	28. XI.	18	8,450	350	—	400	480	1,75	8,40
	29. XI.	19		150	—	50	310	2,01	6,23
	30. XI.	20	8,260	500	—	50	245	2,11	5,16
	1. XII.	21		—	—	50	60	1,87	1,12
3	2. XII.	22	8,100	500	6,0	600	800	1,54	12,36
	3. XII.	23		500	6,0	700	735	1,73	12,77
	4. XII.	24	8,270	—	6,0	850	440	1,48	6,51
4	5. XII.	25	8,400	500	—	—	—	—	—

Tabelle II.

Nr.	Datum	Minuten	Trockensubstanz im Blut Proz.	NaCl im Blut Proz.	NaCl pro 100 Trockensubstanz
Vorperiode	12. XI. 1924 Nüchterner Zustand	0	21,7	0,482	2,22
		30	21,5	0,506	2,35
		60	21,3	0,503	2,36
		90	21,5	0,515	2,39
		120	21,5	0,506	2,35
		150	22,0	0,514	2,33
		180	21,1	0,517	2,45
1	20. XI. 1924 Salz- u. H_2O-reicher Zustand Füttern mit Fleisch	0	21,6	0,476	2,20
		30	21,0	0,485	2,30
		60	20,4	0,499	2,44
		90	20,4	0,509	2,49
		120	20,1	0,518	2,57
		150	21,0	0,497	2,36
		180	20,2	0,523	2,41

Tabelle II (Fortsetzung).

Nr.	Datum	Minuten	Trockensubstanz im Blut Proz.	NaCl im Blut Proz.	NaCl pro 100 Trockensubstanz
2	28. XI. 1924	0	20,1	0,496	2,46
	Salzarmer,	30	20,0	0,500	2,50
	wasserreicher	60	19,4	0,515	2,65
	Zustand	90	19,2	0,532	2,77
	Füttern mit	120	19,6	0,541	2,75
	Fleisch	150	19,4	0,537	2,76
		180	19,3	0,543	2,75
3	2. XII. 1924	0	20,4	0,525	2,57
	Salz- u. wasser-	30	20,3	0,523	2,57
	armer Zustand	60	20,2	0,523	2,58
	Füttern mit	90	19,6	0,535	2,72
	Fleisch	120	19,9	0,531	2,66
		150	19,9	0,540	2,76
		180	20,1	0,544	2,71
4	5. XII. 1924	0	20,1	0,508	2,52
	Salz- u. wasser-	30	20,0	0,508	2,54
	reicher Zustand	60	19,9	0,514	2,58
	Füttern mit	90	19,4	0,537	2,76
	Fleisch	120	19,2	0,548	2,85
		150	19,5	0,555	2,84
		180	19,7	0,565	2,86

Über einige Beziehungen zwischen der Reaktion und dem gesamten Ionengleichgewicht im Blut.

Von

Kl. Gollwitzer-Meier.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 28. Mai 1925.)

Säurebasen und Mineralhaushalt stehen, wie Untersuchungen besonders der letzten Jahre erwiesen, in engen wechselseitigen Beziehungen. In diese Kette von Beziehungen ist auch das Eiweiß der Gewebsflüssigkeit und Zellen mit eingeschlossen, das einmal in seinem Kolloidzustand eine weitgehende Abhängigkeit von den Ionengleichgewichten zeigt, andererseits durch seinen augenblicklichen Kolloidzustand bestimmend ist für die Ionenverteilung zwischen zwei verschiedenen Körperflüssigkeiten, zwischen Zelle und umgebender Flüssigkeit, für die Retention und Ausscheidung von Ionen, sekundär sogar eine vollständige Umstimmung der Ionengleichgewichte erzeugen kann.

Von besonderer Bedeutung für den Säurebasen und Mineralgehalt ist das Atemzentrum vermöge seiner Funktion als Regulator des H—OH-Ionengleichgewichts im Körper. In tierexperimentellen Untersuchungen konnte der Nachweis erbracht werden, daß für die Einstellung der H-Ionenkonzentration des Blutes auf eine gleichmäßige Höhe durch das Atemzentrum die Aufrechterhaltung eines bestimmten Salzmilieus in der das Atemzentrum umspülenden Gewebsflüssigkeit erforderlich ist, wobei jede Veränderung des Milieus den H-Ionenreiz auf das Atemzentrum modifiziert und damit im Enderfolg den H-Ionenspiegel im Blute verschiebt bzw. eine bereits stattgefundene Verschiebung unkompensiert läßt[1]). Gegenstand der Untersuchungen waren die Veränderungen der Ventilationsgröße und des Säurebasengleichgewichts unter dem Einfluß verschiedener Mineralsalze, während die gleichzeitige Verschiebung innerhalb des übrigen Ionenbestandes des Blutes nur eine theoretische Würdigung erfuhr.

---

[1]) *Kl. Gollwitzer-Meier*, diese Zeitschr. **151**, 54, 1924.

Zweck der vorliegenden Untersuchungen ist es, diese Lücke auszufüllen durch möglichst vollständige Analyse des gesamten Ionengehaltes des Blutes bei primären Eingriffen in den Mineral- und Säurebasenbestand. Über das Verhalten einzelner Ionen unter derartigen Einwirkungen ist seit Beginn dieser Versuchsreihe bereits von anderen Autoren berichtet worden. Wenn diese Ionen trotzdem auch weiterhin mit in die Untersuchung einbezogen wurden, so geschah es deshalb, weil bei der speziellen Fragestellung nicht das einzelne Ion, sondern die Wechselbeziehung zwischen verschiedenen Ionen interessierte.

Die Versuche wurden an jüngeren gesunden Erwachsenen ausgeführt. An Stelle der Infusion von Salzlösungen (wie in den Tierexperimenten) wurden die Salze meist per os verabreicht, wodurch einmal die Versuchsdauer wesentlich verlängert wurde und ferner durch die Zwischenschaltung der Leberpassage manche Wirkung etwas abgeschwächt worden sein dürfte [*Beckmann* [1])]. Nach erfolgter Entnahme des Nüchternblutes unter Paraffin wurden die Salze in ein- bis zweimaligen größeren Dosen ($CaCl_2$ 20 g — NH_4Cl 20 g — $NaHCO_3$ 30 bis 40 g) zugleich mit dem ersten bzw. 1 Stunde später mit dem zweiten Frühstück eingenommen und nach 1 bis 2 Stunden eine zweite, eventuell noch eine dritte Blutentnahme vorgenommen. Zu den Zeiten der Blutentnahme erfolgte jedesmal auch eine Analyse der Alveolarluft. Bei der Verarbeitung des Blutes (Bestimmung von p_H, Na, K, Ca, Cl, HCO_3, P anorg.) bediente ich mich derselben Methoden wie in früheren Versuchen [2]).

Bei der Zufuhr und Resorption irgend eines Neutralsalzes wird zunächst das Ionengleichgewicht im Blute gestört durch Erhöhung der Konzentration der gleichnamigen Ionen. So sehen wir nach Verabreichung von $NaHCO_3$ eine Zunahme der Na- und HCO_3-Ionen im Blute, von $CaCl_2$ eine Zunahme der Ca- und Cl-Ionen, eine Vermehrung der Cl-Ionen auch nach NH_4Cl. Es werden aber offenbar die zugeführten Anionen und Kationen nicht in äquivalenten Mengen retiniert, sondern mehr Anionen als Kationen. Infolge der Beschränkung der zur Neutralisierung dieser Säureionen erforderlichen Alkalimengen im Blute ergibt sich die Notwendigkeit der Entfernung anderer Anionen, die zum Teil mit dem nicht retinierten Kation — Na, Ca, NH_4 — durch Niere oder Darm sofort wieder zur Ausscheidung gelangen. Anionenwanderungen zwischen Blut und Gewebe können für diese Ausgleichsvorgänge nur von untergeordneter Bedeutung sein, zumal es sich dabei meist um Austauschvorgänge handelt und durch den Gegenstrom anderer Anionen die Anionensumme im Blute nicht vermindert wird. Diese Verschiebungen gehen zwischen den quantitativ bedeutendsten Anionen im Blute vor sich, den Cl- und HCO_3-Ionen. Es nehmen nach $NaHCO_3$ die HCO_3-Ionen im Blute zu, die Cl-Ionen ab, nach

[1]) *Beckmann*, 37. Kongreß für innere Medizin. Wiesbaden 1925.
[2]) *Kl. Gollwitzer-Meier* und *Chr. Kroetz*, diese Zeitschr. **154**, 82, 1924.

NH_4Cl und $CaCl_2$ die Cl-Ionen zu und die HCO_3-Ionen ab. Auch hier handelt es sich nicht immer um Veränderungen in äquivalenten Mengenverhältnissen. Die HCO_3-Abnahme bleibt nach NH_4Cl hinter der Cl-Zunahme zurück, was folglich zur Vermehrung der gesamten Anionensumme führen muß.

Aus diesen Vorgängen ergibt sich ohne weiteres die Beziehung zum Säurebasengleichgewicht. Wo durch Cl-Ionen HCO_3-Ionen aus ihren Alkaliverbindungen herausgedrängt werden, muß die Alkalireserve abnehmen und die Reaktion saurer werden, wo HCO_3- und Na-Ionen retiniert werden, muß die Alkalireserve und Blutalkaleszenz zunehmen. Auch bei peroraler Verabreichung der Neutralsalze sind die Verschiebungen der Blutreaktion beträchtlich. Die HCO_3—Cl-Wanderung, die bei Veränderung der Blutreaktion als Ausdruck von Pufferungsvorgängen zwischen Blutkörperchen und Serum stattfindet, führt zu Konzentrationsänderungen im Blute, die den beobachteten entgegengesetzt sind, wird also durch die beschriebenen Vorgänge überdeckt.

Nun besitzt nach *Henderson* und *Haggard*[1]) der Körper im Gewebsalkali eine wichtige Reserve zur Kompensierung eines Säureüberschusses im Blute, die zu dessen Neutralisierung in die Blutbahn geschafft wird. In den vorliegenden Versuchen wird Gewebsalkali zum Ausgleich von Störungen im Ionengleichgewicht nicht herangezogen[2]). Der Alkaliüberschuß nach $NaHCO_3$ entstammte nicht dem Gewebe, sondern dem Darm. Eine wesentliche Vermehrung der Gesamtbasenmenge im Blute ist beschränkt auf die $NaHCO_3$-Darreichung, während sie sonst nur wenig zunimmt oder nahezu unverändert bleibt.

Gewisse andere Veränderungen, namentlich die im Ca-, P- und K-Gehalt des Blutes weisen aber doch auf eine Mitbeteiligung der Gewebe. Zweifellos finden unter dem Reiz der primär erzeugten Ionenverschiebung Kolloidveränderungen im Gewebe statt, die ihrerseits weitere Umstellungen im Mineralgehalt hervorrufen. Von besonderer Bedeutung sind die Veränderungen im Ca-Gehalt. Wir sehen eine beträchtliche Ca-Zunahme (abgesehen selbstverständlich von $CaCl_2$) nach NH_4Cl, eine Abnahme nach $NaHCO_3$, wie sie auch von *Haldane*[3]) beobachtet wurde[4]). Auf Grund der Ergebnisse der Tetanieforschung

---

[1]) *Henderson* und *Haggard*, Journ. of biol. Chem. **38**, 333, 1918.

[2]) Natürlich ist damit nicht ausgeschlossen, daß bei länger dauernden Versuchen auch derartige Na-Verschiebungen auftreten können, wie sie *Salvesen*, *Hastings* und *McIntosh* (Journ. of biol. Chem. **60**, 327, 1924) nach mehrtägiger $CaCl_2$-Verabreichung beobachteten.

[3]) *I. B. S. Haldane*, Lancet **206**, 537, 1924.

[4]) Sie wurde auch in drei eigenen Versuchen an Hunden nach intravenöser Infusion von 70 bis 100 ccm 5proz. $NaHCO_3$-Lösung nachgewiesen.

bringt man den Ca-Spiegel des Blutes häufig in einen engeren Zusammenhang mit der Blutreaktion. Suchen wir diesen Zusammenhang hier, so haben wir eine Verminderung des Ca-Gehalts bei der Alkalose, eine Vermehrung bei der Acidose. Über die Berechtigung, diese Zusammenhänge anzunehmen, soll später gesprochen werden.

Verringerung des K-Gehalts war nur nach NH_4Cl, Vermehrung des P-Gehalts nur nach $CaCl_2$ zu beobachten. Den P-Anstieg nach $CaCl_2$ haben *Salvesen*, *Hastings* und *McIntosh*[1]) auch nach intravenösen Infusionen beobachtet[2]). Den Reaktionsverlauf, der zu Phosphatverdrängung aus dem Gewebe und zu einem Anstieg im Blute führt, stellen sich *van Slyke* und *Cullen*[3]) so vor, daß das Dinatriumphosphat der Zelle unter der Einwirkung von eindringenden Cl-Ionen in Monophosphat umgesetzt wird, das zur Ausscheidung gelangt.

Diese sekundären Verschiebungen im Mineralgehalt des Blutes sind uns also ein Ausdruck der chemischen oder physikalisch-chemischen Veränderungen in den Gewebssäften und Gewebseiweißkörpern. Natürlich müssen die genannten Ionenverschiebungen nach ihren äquivalenten Ausmaßen im Rahmen der gesamten Ionenmenge praktisch ohne Einfluß auf die Säurebasenverhältnisse bleiben, und es bedeutet eine beträchtliche Überschätzung dieser Vorgänge, wenn z. B. *Stehle* und *Bourne*[4]) die Verminderung der Alkalireserve bei der Narkose durch einen Phosphateinstrom in das Blut erklären. Die Bedeutung dieser Ionen für die Säurebasenverhältnisse liegt vielmehr zu einem wesentlichen Teil in ihrer Wirkung auf das für Ionenverschiebungen äußerst empfindliche Atemzentrum. Der dafür maßgebende Quotient der äquivalenten Ionenkonzentration $\left(\frac{K \times P}{Ca}\right)$ erfährt unter dem Einfluß der Neutralsalzzufuhr, sei es primär, sei es sekundär durch die Gewebstransmineralisation, charakteristische Veränderungen. Er nimmt durch $NaHCO_3$ zu, durch NH_4Cl und $CaCl_2$ ab[5]). Es würde dies im ersten Falle eine erhöhte, im anderen Falle eine verminderte Empfindlichkeit des Atemzentrums H-Ionenkonzentrationsänderungen

---

[1]) l. c.

[2]) *Salvesen*, *Hastings* und *McIntosh* haben eine Veränderung des K-Gehalts (Abnahme) auch nach $CaCl_2$ gefunden, allerdings wieder in mehrtägigen Versuchen, und *Haldane*, *Wigglesworth* und *Woodrow* (Proc. of the roy. soc. of London, Ser. B, **96**, 1, 1924) eine P-Zunahme nach NH_4Cl, und zwar erst vom dritten Tage ab. Selbstverständlich spielt in derartigen Versuchen immer auch die Kost der Vorperiode eine Rolle, wodurch Differenzen in den beobachteten Ionenverschiebungen bedingt werden können.

[3]) *van Slyke* und *Cullen*, Journ. of biol. Chem. **30**, 289, 1917.

[4]) *Stehle* und *Bourne*, Journ. of biol. Chem. **60**, 17, 1924.

[5]) Es ist dabei natürlich nur eine ziemlich rohe Schätzung der Quotientveränderung möglich.

gegenüber bedeuten, entsprechend den tierexperimentellen Ergebnissen über die $NaHCO_3$- und $CaCl_2$-Wirkung. So ist auch die oft ganz fehlende, oft sehr geringe Veränderung der alveolaren Kohlensäurespannung bei starken Verschiebungen der Blutreaktion zu erklären, die uns allerdings nur bis zu einem gewissen Grade als Maß der Lungenventilation gelten kann. Die Atemtätigkeit wirkt bei den durch Neutralsalzzufuhr erzeugten H-Ionenänderungen nur unvollständig kompensierend infolge der gleichzeitigen Störung im Gleichgewicht anderer Ionen.

Aus der früheren Überlegung, daß weniger die Richtung einer Reaktionsverschiebung als vielmehr die Art ihrer Entstehung für die sekundären Ionenverschiebungen maßgebend ist, ergab sich die Aufgabe, die Ionengleichgewichte auch unter anderen Verhältnissen zu untersuchen, und zwar wurde die Reaktionslage durch Überventilation und Einatmung von Kohlensäure verändert.

Die CO_2-Versuche waren mangels einer geeigneten Atmungskammer nur von kurzer Dauer, 15 bis 20 Minuten. Geatmet wurde aus einem Spirometer, dessen CO_2-Gehalt auf 6 bis 7 Proz. anstieg. Es wurde versucht, die CO_2-Spannung möglichst lange auf dieser Höhe zu halten, wobei zur Vermeidung von Sauerstoffmangel dauernd etwas Sauerstoff nachgegeben wurde. Von den Überventilationsversuchen sei von vier ganz gleichartigen Versuchen nur einer in die Tabelle aufgenommen, da ich bereits früher über derartige Versuche berichtet habe. Die Notwendigkeit einer Wiederholung der Versuche ergab sich aus dem Bedürfnis nach einer vollständigeren Bilanz, als sie damals durchgeführt wurde. Die Atmungsdauer war 30 bis 45 Minuten.

Der Anstoß zur Störung des Ionengleichgewichts im Blute geht in diesen Versuchen von der freien Kohlensäure aus. Da ihre Veränderung hier Ursache der Reaktionsverschiebung war, in den Neutralsalzversuchen Kompensationsvorgang, so muß der Ausschlag dem in den Neutralsalzversuchen gefundenen entgegengesetzt sein bei gleichsinniger Reaktionsverschiebung. Abhängig von der Reaktion vollzieht sich der $Cl-HCO_3$-Austausch zwischen Blutkörperchen und Serum, der hier durch andere Ionenwanderungen nicht überdeckt wird. Soweit können wir die Ionenverschiebungen durch Prozesse innerhalb des Blutes selbst erklären, womit nicht gesagt sein soll, daß nicht auch hier schon geringe Verschiebungen zwischen Blut und Gewebe vor sich gehen können. Das völlig verschiedene Verhalten der CO_2-Spannung, Cl- und HCO_3-Konzentration trotz gleicher Reaktionslage bei den Neutralsalz- und Atmungsversuchen geht am besten aus der schematischen Darstellung in Tabelle I hervor, die vor allem die wichtigsten Veränderungen berücksichtigt.

Sind die weiteren Austauschvorgänge zwischen Blut und Gewebe eine Funktion der Wasserstoffzahl des Blutes, so müssen sie eine Be-

Tabelle I.

	Alkalose	Acidose	
	$NaHCO_3$	NH_4Cl	$CaCl_2$
HCO_3	Zunahme	Abnahme	Abnahme
Cl	Abnahme	Zunahme	Zunahme
P	=	=	Zunahme
Na	Zunahme	=	=
K	=	Zunahme	=
Ca	Abnahme	Zunahme	Zunahme
CO_2-Spannung	Zunahme	Abnahme	ziemlich unverändert

	Überventilation	CO_2-Einatmung
HCO_3	Abnahme	Zunahme
Cl	Zunahme	Abnahme
P	Abnahme	Zunahme
Na	geringe Abnahme	=
K	=	=
Ca	Zunahme	Abnahme
CO_2-Spannung	Abnahme	Zunahme

ziehung zu ihr aufweisen. Die Versuche lassen eine solche Beziehung nicht deutlich erkennen. Trotz alkalischer Reaktion sehen wir bei der Überventilation eine leichte Zunahme des Ca-Gehalts[1]), während die CO_2-Acidose eine Verminderung des Ca-Gehalts zur Folge hat. Wir müssen einen Zusammenhang weniger mit der Blutreaktion, als vielmehr mit den übrigen Blutveränderungen suchen. Dabei handelt es sich natürlich nur um die Beeinflussung des Gesamtkalkes und nicht um die der Dissoziation.

Besondere Beachtung verdient der Phosphatgehalt bei der Überventilation und CO_2-Einatmung, den bereits *György* und *Vollmer*[2]), *Haldane, Wigglesworth* und *Woodrow*[3]) zum Gegenstand ihrer Untersuchungen machten. Es findet während der Überventilation eine Phosphatwanderung in das Gewebe, während der CO_2-Einatmung eine Phosphatwanderung in das Blut statt. Daß diesen Vorgängen tatsächlich ein Austausch zwischen Blut und Gewebe zugrunde liegt und nicht Ausscheidungsveränderungen, beweisen die Versuche von *Haldane, Wigglesworth* und *Woodrow*, die zeigen, daß den Phosphatanstieg im Blute auch eine vermehrte Phosphatausscheidung begleitet und den Phosphatabfall eine verminderte

[1]) Im Gegensatz zu den früheren Versuchen wurde eine geringe Ca-Zunahme hier ganz regelmäßig gefunden. Dem entsprechen auch die Angaben von *Grant* und *Goldman* und *György* und *Vollmer* (diese Zeitschr. **140**, 391, 1923).

[2]) l. c.

[3]) *I. B. S. Haldane, Wigglesworth* und *Woodrow*, Proc. of the roy. soc. of London, Ser. B, **96**, 1, 1924.

Phosphatausscheidung. Die Erklärung hierfür suchen die genannten Autoren in der Veränderung der H-Ionenkonzentration. Das Fehlen von Phosphatwanderungen nach NH_4Cl und $NaHCO_3$ lassen es zweifelhaft erscheinen, daß die H-Ionenkonzentration an sich diese Ionenbewegung beeinflußt. Man mag nach dem Vorgehen von *van Slyke* und *Cullen* an einen Zusammenhang mit Cl- und HCO_3-Verschiebungen denken, obwohl auch hierfür sichere Beweise fehlen.

Die Versuche zeigen also die Möglichkeit gegensätzlicher Ionengleichgewichtsveränderungen innerhalb des Blutes selbst bei gleichsinniger Verschiebung der Reaktion. Es scheint ein viel innigerer Zusammenhang zu bestehen zwischen den primären Cl-, HCO_3- und CO_2-Veränderungen im Blute und der sekundären, vom Gewebe ausgehenden Transmineralisation, als zwischen dieser und der H-Ionenkonzentration des Blutes. Die Ursache kann zum Teil in dem rascheren Eindringen bestimmter Ionen gesucht werden, die Kolloidveränderungen und Ionenverschiebungen auslösen, noch bevor der Reaktionsausgleich solche verursacht.

Mit dem Ionengleichgewicht im Blute verändert sich bei den Atmungsversuchen auch wieder der Quotient der äquivalenten Ionenkonzentration. Er wird während der Überventilation kleiner, während der CO_2-Einatmung größer, vermindert also im ersteren Falle die Reaktion des Atemzentrums auf Änderungen der H-Ionenkonzentration und steigert sie im anderen Falle. Durch die gleichzeitige Veränderung der CO_2-Spannung im Blute, die für die Reaktion im Atemzentrum selbst vermöge der besonderen Permeabilität der undissoziierten Kohlensäure von großem Einfluß ist[1]), scheint zunächst die Bedeutung der Quotientveränderung etwas in den Hintergrund gerückt. Und doch sind verschiedene Erscheinungen nur durch letztere zu erklären, so das Fehlen jeder Hyperpnoe bei acidotisch wirkenden Neutralsalzen auch dort, wo die CO_2-Spannung im Blute etwas ansteigt; ferner das Ausbleiben einer Hyperpnoe bei einer Blutacidose, wo zeitlich (3 bis 4 Stunden) wohl ein Reaktionsausgleich zwischen Blut- und Atemzentrum hatte stattfinden müssen.

Alle Veränderungen der H-Ionenkonzentration erweisen sich von Verschiebungen im Gleichgewicht der übrigen Ionen begleitet, die freilich durchaus nicht gleichartig zu sein brauchen. Man muß sich deshalb einer gewissen Willkür bewußt sein, wenn man aus diesem engverknüpften Ionengefüge eine anscheinend besonders wirksame Ionenart herausgreift und unter Vernachlässigung der übrigen ihre Bedeutung für irgend einen biologischen Vorgang untersucht.

---

[1]) *H. Winterstein*, Naturwissenschaften 28, 625, 1923.

Tabelle

Blutentnahme	HCO_3 als CO_2-Vol.-Proz.	HCO_3 äquiv.	Cl als NaCl mg-Proz.	Cl äquiv.	P (anorg.) mg-Proz.	P (anorg.) äquiv.
$NaHCO_3$.						
Vorher	59,6	0,0266	580	0,0991	2,62	0,0013
Infus. v. 300 ccm 3 proz. Lösung 10 Min. später	72,1	0,0321	562	0,0960	2,55	0,0013
Vorher	57,0	0,0253	597	0,1020	2,90	0,0015
30 g $NaHCO_3$ per os. 1 Std. später	74,3	0,0331	573	0,0979	2,85	0,0014
Vorher	53,8	0,0240	561	0,0939	2,67	0,0013
40 g $NaHCO_3$ per os. 1½ Std. später	67,2	0,0300	542	0,0926	2,79	0,0014
Vorher	60,3	0,0269	620	0,1060	2,70	0,0014
40 g $NaHCO_3$ per os. 1 Std. später	70,2	0,0312	608	0,1039	2,67	0,0013
NH_4Cl[1].						
Vorher	53,3	0,0237	579	0,0990	2,58	0,0013
2 mal 10 g NH_4Cl. 1½ Std. später	40,3	0,0179	650	0,1111	2,58	0,0013
Vorher	56,7	0,0253	564	0,0964	2,60	0,0013
2 mal 10 g NH_4Cl. 1½ Std. später	35,4	0,0157	643	0,1099	2,76	0,0014
Vorher	57,0	0,0254	554	0,0946	2,95	0,0015
2 mal 10 g NH_4Cl. 1½ Std. später	47,0	0,0209	597	0,1020	3,20	0,0016
3 Std. später	41,0	0,0179	646	0,1104	3,25	0,0016
Vorher	54,8	0,0245	566	0,0967	2,34	0,0012
2 mal 10 g NH_4Cl. 1 Std. später	41,3	0,0184	623	0,1064	2,64	0,0013
Vorher	46,5	0,0207	602	0,1029	2,57	0,0013
2 mal 10 g NH_4Cl. 2 Std. später	30,8	0,0137	655	0,1119	2,50	0,0013
$CaCl_2$[1].						
Vorher	62,0	0,0276	578	0,0988	2,56	0,0015
2 mal 10 g $CaCl_2$. 1½ Std. später	45,2	0,0201	618	0,1056	3,12	0,0016
Vorher	58,6	0,0261	567	0,0969	3,63	0,0018
2 mal 10 g $CaCl_2$. 2 Std. später .	49,5	0,0221	594	0,1015	4,08	0,0020
Überventilation.						
Vorher	60,6	0,0269	581	0,0993	2,66	0,0013
35 Min. überventiliert	48,2	0,0215	595	0,1016	1,75	0,0008
CO_2-Einatmung.						
Vorher	60,2	0,0268	571	0,0976	2,30	0,0011
Nachher	65,5	0,0292	541	0,0924	3,00	0,0015
Vorher	64,6	0,0288	606	0,1036	2,83	0,0014
Nachher	71,1	0,0317	587	0,1003	3,24	[illegible]
Vorher	58,1	0,0259	585	0,1000	1,89	[illegible]
Nachher	66,0	0,0299	572	0,0977	2,50	0,0013

[1]) Das Salz wurde in zwei Portionen in Abständen von einer Stunde per os eingenommen. Die Ang...

II.

Na		K		Ca		Anionensumme	Kationensumme	p_H des Blutes	Alveolare CO_2
mg-Proz.	äquiv.	mg-Proz.	äquiv.	mg-Proz.	äquiv.				
303	0,1317	25,1	0,0064	11,1	0,0055	0,1270	0,1436	7,30	38,1
308	0,1329	24,8	0,0063	9,9	0,0050	0,1294	0,1452	7,41	39,9
315	0,1369	21,3	0,0055	11,2	0,0056	0,1288	0,1480	7,30	44,1
336	0,1460	22,0	0,0056	10,5	0,0052	0,1324	0,1568	7,37	46,1
296	0,1287	21,5	0,0055	11,0	0,0055	0,1212	0,1396	7,33	35,5
321	0,1395	20,3	0,0052	9,2	0,0046	0,1240	0,1493	7,39	39,5
338	0,1470	22,1	0,0056	9,3	0,0046	0,1343	0,1572	7,32	37,3
356	0,1547	23,1	0,0059	8,8	0,0044	0,1364	0,1650	7,38	39,7
305	0,1326	21,1	0,0054	9,0	0,0045	0,1250	0,1425	7,29	34,5
315	0,1369	22,5	0,0057	9,9	0.0050	0,1303	0,1476	7,19	29,9
295	0,1282	22,6	0,0058	9,0	0,0045	0,1230	0,1385	7,33	35,5
296	0,1284	24,0	0,0061	10,1	0,0050	0,1270	0,1395	7,29	31,2
324	0,1408	24,6	0,0063	9,4	0,0043	0,1215	0,1518	7,30	39,0
322	0,1400	26,0	0,0067	10,7	0,0053	0,1245	0,1520	7,20	40,5
325	0,1413	26,9	0,0068	10,8	0,0054	0,1299	0,1535	7,20	33,3
292	0,1269	24,7	0,0063	9,4	0,0047	0,1224	0,1379	7,30	40,8
293	0,1270	26,5	0,0068	11,0	0,0055	0,1261	0,1393	7,23	40,5
310	0,1348	19,7	0,0054	10,1	0,0050	0,1249	0,1448	7,30	38,0
310	0,1348	21,0	0,0058	11,0	0,0055	0,1269	0,1457	7,18	36,0
294	0,1278	21,2	0,0055	10,5	0,0052	0,1277	0,1385	7,31	37,4
295	0,1282	20,7	0,0053	13,1	0,0065	0,1273	0,1400	7,25	36,4
321	0,1395	20,8	0,0053	10,4	0,0052	0,1248	0,1500	7,30	37,2
321	0,1395	20,8	0,0053	12,2	0,0061	0,1256	0,1509	7,22	39,5
314	0,1365	19,7	0,0050	10,2	0,0051	0,1275	0,1466	7,32	38,2
302	0,1313	20,2	0,0051	10,7	0,0053	0,1239	0,1417	7,46	21,5
321	0,1395	21,9	0,0056	11,0	0,0055	0,1355	0,1506	7,36	37,4
327	0,1421	21,8	0,0056	10,2	0,0051	0,1331	0,1528	7,27	51,0
302	0,1313	21,6	0,0055	9,0	0,0045	0,1338	0,1413	7,32	36,1
301	0,1309	21,9	0,0056	8,8	0,0044	0,1336	0,1409	7,22	50,5
317	0,1378	25,6	0,0065	11,0	0,0055	0,1268	0,1498	7,35	37,3
315	0,1369	25,9	0,0066	10,3	0,0052	0,1289	0,1487	7,27	49,8

über den Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme bezieht sich auf die Einnahme der zweiten Salzportion.

Untersuchungen über die fördernde Wirkung des anämischen Blutes auf die Blutkörperchenbildung.

Von

J. Förster und F. Kiss.

(Aus der I. medizinischen Klinik der k. ungar. Pázmány-Péter-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 29. Mai 1925.)

Nach hochgradigen Blutverlusten beginnt, wie bekannt, eine lebhafte Bildung der roten Blutkörperchen, die Zahl derselben steigt von Tag zu Tag an, bis sie nach einer gewissen Zeit endlich die für die betreffende Tierart oder für den Menschen charakteristische Blutkörperchenzahl erreicht. Auf welche Art und Weise diese Regeneration zustande kommt, was den Blutkörperchen bildenden Prozeß in Gang setzt bzw. warum das Knochenmark rote Blutkörperchen in gesteigertem Maße in den Kreislauf abgibt, sind Fragen, die wir heute noch nicht beantworten können. Es ist unwahrscheinlich, daß die Regeneration nach Blutverlusten durch einen Nervenimpuls in Gang gesetzt würde, weil das Blut und das Knochenmark ja in keinem Zusammenhang mit dem Nervensystem stehen. Am meisten auf der Hand liegt also die Auffassung, daß das Milieu des Körpers infolge der Anämie verändert wird und demzufolge im Blute solche Stoffe erscheinen, die auf das Knochenmark einen formativen Reiz ausüben, und das Resultat davon ist das Ansteigen der Blutkörperchenzahl und die Restitutio ad integrum.

Über den Entstehungsort und über die chemische Zusammensetzung dieser Substanzen wissen wir gar nichts, ist doch auch ihr Vorhandensein bestritten, obgleich zahlreiche Untersuchungen für ihre Existenz sprechen.

Zuerst wurde 1895 von *Danilewsky* und *Selensky* nachgewiesen, daß bei Hunden und Kaninchen die Injektion von Milz und Knochenmarksextrakten eine Erhöhung der Blutkörperchenzahl und des Hämoglobingehaltes hervorruft. *Carnot* und *Deflandre* berichten in zwei Mitteilungen darüber, daß das Serum von durch Venäsektion anämisierten Tieren dieselbe Blutkörperchen bildende Eigenschaft besitzt und ziehen daraus den Schluß,

daß im Serum ein Stoff vorhanden ist, der fördernd auf die Bildung der roten Blutkörperchen einwirkt. Diese Stoffe haben sie „*Hämopoietine*" genannt. Die Hämopoietine werden bei 55° C vernichtet, und ihre Aufgabe ist, die Hämopoiese in Gang zu setzen bzw. den Gang der Blutkörperchenbildung zu regulieren. Sie fanden, daß die Milz der anämischen Tiere gleichfalls wirksam ist, während andere Organe keine solche hämopoietische Wirkung haben. Sie schließen daraus, daß die Hämopoietine in der Milz entstehen. Im Blute von normalen, nicht anämischen Tieren haben sie solche hämopoietisch wirkende Stoffe nicht gefunden. Nach *Kapinow* wird die Blutbildung durch die Blutlipoide gesteigert; bei durch Venäsektion anämisch gemachten Kaninchen war unter der Wirkung der Blutlipoide von Rindern die Regenerationsperiode halb so lang als bei den unbehandelten Tieren. Die hämopoietische Wirkung ist also seiner Meinung nach an die Lipoide gebunden. Die Untersuchungen von *Carnot* wurden auch von *Gibelli* wiederholt und teilweise bestätigt. Er verabreichte normalen, nicht anämischen Tieren das Serum von mittels Venäsektion oder Phenylhydrazininjektionen anämisierten Tieren und fand, daß die Zahl der roten Blutkörperchen unter der Wirkung dieses Serums ansteigt. Wenn er aber dasselbe Serum von anämischen Tieren einem gleichfalls anämisch gemachten Tiere injizierte, blieb die hämopoietische Wirkung aus. Aus diesem Grunde nimmt *Gibelli* an, daß das Serum des anämischen Tieres nur dann seine hämopoietische Wirkung entfaltet, wenn es „intra vitam an normales Serum gebunden wird". Nach *Müllers* Untersuchungen an Mäusen und Meerschweinchen kann die Blutkörperchenbildung der anämisch gemachten Tiere durch Behandlung mit dem Serum normaler, nicht anämisierter Tiere nicht beeinflußt werden; wenn man aber das Serum eines anämischen Tieres verabreicht, kann die Abnahme der roten Blutkörperchenzahl verhindert werden. Das anämische Serum ist in bezug auf diese Wirkung thermo- und koktostabil, büßt sie also weder bei 56° C noch nach Aufkochen ein. Dieselbe hämopoietische Wirkung besitzt auch das Serum von solchen Meerschweinchen, die eine längere Zeit unter vermindertem Luftdruck verbracht haben. Eine gleichfalls rote Blutkörperchen bildende Eigenschaft kommt auch den wässerigen Extrakten aus Knochenmark und Leucocyten eines anämischen Tieres zu.

Auch in den letzteren Zeiten sind Untersuchungen zur Klärung dieser Frage ausgeführt worden. So gab *Giribaldi* durch Glycerin anämisierter Tieren ein Serum von anämischen Tieren; auch er stellte fest, daß dieses Serum einen blutbildenden Reiz ausübt. *Heinz* nennt die roteBlutkörperchen bildenden Stoffe „*Blutaktolen*". Normalen, nicht anämischen Tieren injizierte er intravenös das Blutplasma von mittels Venäsektion und Phenylhydrazin hochgradig anämisierten Tieren und sah nach 24 Stunden große und polychromatische Erythrocyten und Erythroblasten im Blute erscheinen. Einer von uns (*Förster*) hat im *Institut für Hochgebirgsphysiologie und Tuberkuloseforschung in Davos* mit dieser Frage zusammenhängende Versuche ausgeführt, deren Ergebnisse wir im folgenden zusammenfassen können: Das Serum eines anämischen Tieres hat zweifellos einen Einfluß auf die Blutkörperchenbildung des anämischen Tieres. Seine Wirkung besteht darin, daß es den Regenerationsvorgang beschleunigt. In diesem Serum sind Stoffe vorhanden, die ohne Zweifel mit der Blutkörperchenersetzung im Zusammenhang stehen. Diese Wirkung besitzt auch das Serum solcher Tiere, die längere Zeit lang unter vermindertem Luftdruck gelebt haben. *Laeke* und *Bacon* haben unlängst gefunden, daß in der Milz

und im Knochenmark Stoffe enthalten sind, die einen Einfluß auf die Regeneration der Blutkörperchen haben und die sie deshalb „*erythropoietische Hormone*" nennen. Sie stellen folgende Eigenschaften dieser Hormone fest: sie widerstehen der Austrocknung und dem Kochen bei 100° C, sind in Wasser löslich und werden durch Alkohol inaktiviert. Sie sind nicht nur nach intravenöser und subkutaner Verabreichung, sondern auch per os wirksam.

Aus alledem ist zu ersehen, daß die Annahme der Existenz hämopoietischer Stoffe eine immer festere Basis gewinnt, und daß sogar in bezug auf ihre einzelnen Eigenschaften die Ansichten ziemlich übereinstimmen. In unseren vorhergehenden Untersuchungen waren wir bestrebt, darüber eine Aufklärung zu verschaffen: 1. ob diese hämopoietische Wirkung gesteigert werden kann, wenn man das blutspendende Versuchstier durch häufige Blutentnahmen wiederholt anämisiert, und 2. ob die hämopoietische Wirkung an die Blutkörperchen, an das Serum oder an das Plasma geknüpft ist.

Zu unseren Versuchen verwendeten wir Kaninchen. Die Tiere wurden teilweise aus der mittels Einreibung von Toluol oder Xylol erweiterten Ohrvene, teilweise durch Herzpunktion anämisch gemacht. Wir haben $1/3$ bis $1/4$ der aus dem Körpergewicht berechneten Blutmenge entnommen. Die Zählung der Blutkörperchen führten wir im *Bürker*schen Apparat durch, in jedem Falle wurden 800 bis 1000 rote Blutkörperchen gezählt. Eine Gruppe unserer Versuchstiere haben wir nach Zählung der Blutkörperchen anämisch gemacht und beobachteten an den folgenden Tagen die spontane Hämatopoiese mit täglich vorgenommenen Blutkörperchenzählungen. Die andere Gruppe unserer Tiere haben wir nach Blutkörperchenzählung und Anämisierung mit dem Plasma, dem Serum oder den hämolysierten roten Blutkörperchen eines anämischen Tieres behandelt. Das anämische Serum bzw. Plasma erhielten wir von Kaninchen, die wir eine gewisse Zeitlang täglich oder jeden dritten bis vierten Tag anämisiert hatten. Dem Kaninchen z. B., welches uns für die vorliegenden Versuche das anämische Serum bzw. Blut lieferte, hatten wir binnen 25 Tagen in kürzeren oder längeren Zeiträumen insgesamt 130 ccm Blut entnommen. Das Blut dieses schwer anämisch gemachten Kaninchens ist in unseren Versuchen verwendet worden. Einen Teil des Blutes haben wir, ohne zu defibrinieren, aufgefangen und nach der Gerinnung aus dem so gewonnenen Serum je 2,5 ccm dem tags zuvor anämisierten Kaninchen in die Ohrvene injiziert. Der andere Teil des Blutes wurde mit einer minimalen Menge pulverförmigen Natriumoxalats aufgefangen und sofort zentrifugiert. Von dem so erhaltenen Plasma injizierten wir je 2,5 ccm einer anderen Gruppe unserer Kaninchen, die zurückgebliebenen Blutkörperchen wurden mit destilliertem Wasser hämolysiert und dann

an einer weiteren Gruppe von Kaninchen in ähnlicher Weise angewendet.

Den Gang der spontanen Regeneration haben wir in Tabelle I zusammengefaßt.

Tabelle I.

Nicht behandelte Kontrolltiere.

Tier Nr.	1	2	5	6
	Blutkörperchenzahl			
Vor der Blutentnahme	4 100 000	5 000 000	4 540 000	4 450 000
Entnommene Blutmenge	36 ccm	28 ccm	27 ccm	34 ccm
1. Tag	3 060 000	4 360 000	3 560 000	3 190 000
2. „	2 850 000	4 100 000	3 400 000	3 000 000
3. „	3 000 000	4 170 000	3 530 000	4 000 000
4. „	3 100 000	4 000 000		4 230 000
5. „	3 150 000	4 070 000		4 200 000
6. „	3 540 000	4 300 000		
7. bis 10. Tag	{ 3 770 000 4 200 000	4 450 000		

Hieraus sehen wir, daß die Blutkörperchenzahl am Tage nach der Anämisierung noch im Sinken begriffen ist, am dritten Tage den Wert des ersten Tages erreicht oder übersteigt, danach langsam ansteigt und die ursprüngliche Zahl erst am achten bis zehnten Tage nach der Blutentnahme erreicht.

Der Regenerationsvorgang wird beschleunigt, wenn man dem Tiere am Tage nach der Blutentnahme das Serum, das Plasma oder die hämolysierten Blutkörperchen eines anämischen Tieres injiziert. In diesen Fällen, wie es Tabelle II beweist, sehen wir am Tage nach der

Tabelle II.

Behandelte Tiere.

Tier Nr.	3	4	7	8	9	10	11
	Blutkörperchenzahl						
Vor d. Blutentn.	4 770 000	4 900 000	4 820 000	4 900 000	4 670 000	5 000 000	4 950 000
Blutentnahme	28 ccm	30 ccm	32 ccm	30 ccm	23 ccm	33 ccm	25 ccm
1. Tag	3 500 000	3 470 000	4 000 000	3 450 000	3 730 000	3 480 000	3 250 000
Behandlung	je 2,5 ccm Plasma i. V.		je 2,5 ccm Serum i. V.		je 3 ccm hämolysierte rote Blutkörperchen i. V.		je 3 ccm hämolysierte Vollblut i. V.
2. Tag	4 100 000	3 650 000	4 330 000	4 200 000	4 070 000	3 580 000	4 070 000
3. „	4 300 000	4 180 000	4 400 000	4 400 000	4 230 000	4 370 000	4 300 000
4. „	4 620 000	4 400 000	4 590 000	4 500 000	4 300 000	4 360 000	
5. „	4 790 000	4 650 000	4 590 000	4 560 000	4 540 000	4 520 000	4 330 000
6. „	4 900 000		4 880 000		4 840 000		
7. „	4 920 000		4 910 000		5 000 000		4 800 000

Blutentnahme keine weitere Abnahme der Blutkörperchenzahl, wir beobachteten sogar in allen Fällen eine ausdrückliche Erhöhung derselben. Der Regenerationsprozeß ist auch nicht so langsam wie bei den unbehandelten Tieren, die ursprüngliche Blutkörperchenzahl ist bereits am fünften Tage zu beobachten.

Wenn wir unsere Werte in Prozentzahlen ausdrücken, und zwar die nach der Blutentnahme an demselben Tage gefundene Blutkörperchenzahl gleich 100 Proz. setzen und die an den folgenden Tagen beobachtete Ab- oder Zunahme auf diesen Wert beziehen, gelangen wir zu Zahlen, die unsere Ergebnisse sehr gut veranschaulichen und deren Mittelwerte zur Vergleichung geeignet sind.

Tabelle III.

	Nicht behandelte Tiere					Behandelte Tiere							
	1	2	5	6	Mittelwerte	3	4	7	8	9	10	11	Mittelwerte
						Plasmatiere		Serumtiere		mit hämolysierten Blutkörp. beh. Tiere		mit hämol. Vollblut beh. Tiere	
	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
1. Tag	100	100	100	100	= 100	100	100	100	100	100	100	100	= 100
2. „	89	94	95	94	= 93	116	103	108	123	110	113	124	= 114
3. „	98	96	99	124	= 104	122	120	110	129	114	137	132	= 124
4. „	100	91		133	= 108	131	127	114	132	115	137		= 126
5. „	103	94		132	= 109	137	134	114	132	122	142	132	= 131
6. „	115	94			= 107	139		122		130			= 130
7. „	122	102			= 112	140		123		134		148	= 137

Bei unseren nicht behandelten Kontrolltieren ist der Durchschnittswert am Tage nach der Blutentnahme *um 7 Proz. gesunken*. Wenn wir dem Tiere nach der Blutentnahme das Serum eines Tieres injizieren, das wir durch einmalige Blutentnahme anämisiert hatten, dann *bleibt* — wie das einer von uns gezeigt hat — *die Abnahme am Tage nach der Blutentnahme aus*, die Blutkörperchenzahl stimmt mit der des vorigen Tages überein und zeigt schon am zweiten Tage eine Erhöhung um 13 Proz. Wenn wir dem anämischen Tiere das Serum, Plasma oder die hämolysierten Blutkörperchen eines solchen Tieres geben, das wir durch wiederholte Blutentnahmen anämisch gemacht hatten, dann finden wir am Tage nach der Blutentnahme *eine Erhöhung von* 14 *Proz.*, am folgenden Tage beobachten wir sogar eine Steigerung der Blutkörperchenzahl um 24 Proz.

Einen ausgeprägten Unterschied zwischen den mit Serum, Plasma und den mit hämolysierten roten Blutkörperchen behandelten Tieren sehen wir nicht. Mit Sicherheit kann nur die Tatsache festgestellt werden, daß das Blut des anämischen Tieres auf die Entstehung der roten Blutkörperchen einen Einfluß hat, daß es die am Tage nach

der Blutentnahme sich einstellende Abnahme verhindert, sie sogar überkompensiert, und daß es die Dauer der Regeneration verkürzt. Die Wirkung stellt sich vielleicht am ausgeprägtesten ein, wenn wir dem anämischen Tiere das hämolysierte volle Blut — also Blutkörperchen und Plasma — injizieren. Diese Wirkung des anämischen Blutes und Serums kann gesteigert werden, denn wir sehen, daß das Blut eines *wiederholten* Blutverlusten ausgesetzten Tieres eine erhöhte hämopoietische Wirksamkeit entfaltet.

Wie können wir die Wirkung des anämischen Serums erklären? Am meisten auf der Hand zu liegen scheint die Wirkung auf das Knochenmark; im anämischen Blute sind ganz gewiß Stoffe vorhanden, die eine Reizwirkung auf das Knochenmark ausüben und dadurch die Blutkörperchenentstehung beschleunigen, oder die bereits fertigen Blutkörperchen schneller in den Kreislauf gelangen lassen.

Zusammenfassung.

1. Das Blut der anämischen Tiere hat zweifellos eine hämopoietische Wirkung.

2. Die hämopoietische Wirkung kann gesteigert werden, indem man das blutspendende Tier durch häufige Blutentnahmen anämisiert.

3. Die Regeneration nach dem Blutverlust wird nicht nur durch das anämische Serum, sondern auch durch das Plasma und die hämolysierten Blutkörperchen gefördert.

Literatur.

Danilewsky und *Selensky*, Pflügers Arch. **61**, 1895. — *Carnot* et *Deflandre*. C. r. Acad. d. sciences **143**, 1906. — *Kapinow*, diese Zeitschr. **30**, 1910. — *Gibelli*, Arch. f. exper. Path. **65**, 1911. — *Müller*, Arch. f. Hyg. **76**, 1912. — *Giribaldi*, Biochem. e terap. sperim. **7**, 1920. — *Heinz*, Deutsch. med. Wochenschr. Nr. 25, 1920. — *Förster*, diese Zeitschr. **145**, 1924. — *Laeke* and *Bacon*. Journ. of Pharm. and exper. Ther. **28**, 1925.

Die Einwirkung von Salzsäure und von Pepsin und Salzsäure auf gelöste Eiweißkörper.

Von

H. W. van Urk.

(Aus dem Marinehospital Willemsoord in Helder, Holland.)

(Eingegangen am 30. Mai 1925.)

Im Jahre 1911 haben *Abderhalden* und *Steinbeck*[1]) auf die merkwürdige Tatsache hingewiesen, daß die Wirkung des Pepsins im Magensaft sich mit Hilfe der *Abderhalden*schen optischen Methode nicht bei Anwendung gelöster oder genuiner Proteine feststellen läßt, wohl aber bei Gebrauch von geronnenen oder festen Proteinen. Die Säure allein übt nämlich dieselbe Wirkung wie Magensaft auf gelöste Proteine hinsichtlich der optischen Drehung aus. Bei festen Proteinen ist ein deutlicher Unterschied wahrzunehmen: bei Pepsin und Salzsäure nimmt die Drehung fortwährend zu, dagegen ist bei Salzsäure allein keine Änderung zu konstatieren.

Im folgenden glaube ich eine einfache Erklärung dieser merkwürdigen Tatsache gegeben zu haben. Eine Eiereiweißlösung wurde mit Pepsin und Salzsäure digeriert und von Zeit zu Zeit analysiert. Das Acidalbumin wurde durch Neutralisieren der Flüssigkeit gefällt und gewogen, und die optische Drehung der Flüssigkeit vor und nach der Fällung des Acidalbumins bestimmt. Ebenfalls wurde im Filtrat des Acidalbumins vor und nach der Koagulation des noch vorhandenen Eiweißes die Drehung bestimmt. In derselben Weise die Refraktion der Flüssigkeit bestimmt.

---

[1]) Beitrag zur Kenntnis der Wirkung des Pepsins und Salzsäure. Zeitschr. d. physiol. Chem. 68, 293, 1911.

2proz. Eiweißlösung, 0,25proz. Salzsäure, 25 ccm 0,1proz. Pepsinlösung. Temperatur 37,5°.

Digestionszeit in Stunden	Gewicht des Acidalbumins g	Drehung vor der Fällung des Acidalbumins	Drehung nach der Fällung des Acidalbumins	Refraktion vor der Fällung des Acidalbumins	Refraktion nach der Fällung des Acidalbumins	Gewicht des Eiweißes g	Drehung vor der Fällung des Eiweißes	Drehung nach der Fällung des Eiweißes
0		—1,1°						
1	0,622	—1,9	—1,1°	1,337	1,3365	0,060	—1,1°	—1°
2	0,542	—2,1	—1,2	1,3367	1,3355	0,030		
4	0,399	—2,2	—1,5	1,3365	1,336			
6	0,292	—2,2	—1,7	1,3365	1,3361			
10½	0,247	—2,2	—1,7	1,3365	1,3362			
25	0,219	—2,3	—1,8	1,3363	1,3363			
48	0,211	—2,3	—1,8	1,3367	1,3364			

Der Polarisationsapparat, der mir zur Verfügung stand, war leider nur in 0,1° abzulesen, weshalb die Bestimmungen keine große Genauigkeit beanspruchen können, was aber auf die Erklärung ohne Einfluß ist.

Die spezifische Drehung des Acidalbumins, die sich in der Literatur nicht vorfindet, kann aus den Bestimmungen wie folgt geschätzt werden:

Mittel der Drehungsänderung des Acidalbumins im 2-dm-Rohr:

Gewicht des Acidalbumins pro 100 ccm	Drehungsunterschied vor und nach der Fällung	$[\alpha]_D$
0,582	—0,9°	—77,3°
0,400	—0,7	—87,5
0,292	—0,5	—85,6

Berechnungsbeispiel:

$$[\alpha]_D = \frac{100 \text{ ccm}}{l \cdot p},$$

l = Rohrlänge, p = Anzahl Gramme des Stoffes in 100 ccm Flüssigkeit,

$$\frac{100 \cdot 0{,}9}{2 \cdot 0{,}582} = -77{,}3^0.$$

Als ein annähernder Wert kann daraus abgeleitet werden:

$[\alpha]_D$ Acidalbumin $= -83^0$.

$[\alpha]_D$ des Eiweißes, bestimmt mit Eiereiweiß, war $-28{,}5^0$.

Aus den oben erwähnten Tatsachen läßt sich nun die folgende Erklärung der von *Abderhalden* und *Steinbeck* konstatierten Tatsache ableiten:

Die Bildung des Acidalbumins aus Eiweiß ist verknüpft mit einer starken Zunahme der Linksdrehung, wie aus den Werten von $[\alpha]_D$ für Acidalbumin und Eiweiß hervorgeht. Die Annahme, daß mit dieser Bildung eine intramolekulare Umlagerung vor sich geht, ist durchaus wahrscheinlich.

Diese Bildung findet sowohl durch Salzsäure allein, wie durch Pepsin und Salzsäure statt. Bei der Einwirkung von Pepsin und Salzsäure entsteht aus dem Acidalbumin darauf eine Mischung von Proteosen und Peptonen. Weil die Linksdrehung des entstandenen Gemisches von Proteosen und Peptonen nahezu der des Acidalbumins, woraus es entstanden ist, gleich ist, bleibt die totale Drehungsänderung konstant. Das gleiche Endresultat wird aber in durchaus verschiedener Weise erreicht. Nach Neutralisation der Digestionsflüssigkeit und Abfiltrieren des Acidalbumins findet man deshalb nach Einwirkung von Pepsin und Salzsäure eine große Zunahme der Linksdrehung im Filtrat, was nicht der Fall ist nach Einwirkung von Salzsäure allein.

Aus den Versuchen geht hervor, daß die optische Drehung, in bestimmter Weise limitiert, brauchbar ist zur Verfolgung des Fortschreitens des Digestionsprozesses. Der Drehungsunterschied vor und nach der Fällung des Acidalbumins ist ein Maßstab für die noch vorhandene Menge dieses Stoffes, und die Drehungsänderung des Filtrats für die Menge der entstandenen Proteosen und Peptone.

Eine Hinweisung auf die bekannten Methoden von *Schütz* und *Schütz* und *Hüppert*, die in etwas anderer, sehr komplizierter Weise die spezifische Drehung der sekundären Albumosen zur Bestimmung der Pepsinmenge anwenden, dürfte hier am Platze sein.

Die Refraktion läßt sich für eine Bestimmung des proteolytischen Vermögens nicht anwenden. Die totale Refraktion nimmt anfangs etwas ab, um später etwas zuzunehmen. Die Refraktion des Filtrats nimmt langsam ab. Die Unterschiede betreffen nur die vierte Dezimale.

Pharmakologische Untersuchung einiger neuen proteinogenen Choline.

Von

T. Gordonoff.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 30. Mai 1925.)

Mit 11 Abbildungen im Text.

Den Ausgang dieser Arbeit bildete die bedeutsame chemische Untersuchung *Karrers* über die Entstehung von Cholinen aus natürlichen Aminosäuren, die sogenannten *proteinogenen Choline Karrers*[1]).

Noch vor kurzer Zeit zählte man das Cholin zu den schädlichen Abfallsprodukten der Zellen aus ihrem Phosphatidstoffwechsel. *Magnus*[2]) und seine Mitarbeiter haben durch ihre Entdeckungen dem Cholin eine bedeutende Rolle im Organismus zugewiesen. Es ist *Magnus* gelungen, nachzuweisen, daß die nervösen Gebilde des Darmes auf das Cholin als Erreger ihrer Funktion spezifisch eingestellt sind. *Magnus* sieht das Cholin als das Hormon der Darmbewegungen an. *Asher*[3]) reiht das Cholin in die Gruppe der „individuell", d. h. örtlich wirkenden Hormone. Bekanntlich teilt *Asher* alle Hormone in zwei Gruppen ein: in individuell wirkende, die am Orte ihrer Wirksamkeit entstehen, und generell wirkende, die ihre Bildungsstätte in eigens hierzu bestimmten Organen haben.

Man findet das Cholin hauptsächlich als Baustein des Lecithins, in den Phosphatiden, aber auch im freien Zustand in vielen tierischen und pflanzlichen Organen, in vielen, wenn nicht in allen Exkreten und Sekreten des menschlichen und tierischen Organismus. Das Cholin soll nun in Analogie zum Adrenalin mit seiner Wirkung auf den Sympathicus, ein Ladungshormon des Parasympathicus sein. Es ist eine parasympathisch fördernde Substanz.

Die Rolle des Cholins im Organismus ist, wie gesagt, klar gestellt, dagegen herrscht noch keine Einigkeit betreffs seiner Entstehung im Organismus.

Trier meinte, der Glykolaldehyd bilde sich durch Aldolkondensation aus dem Formaldehyd. Aus Glykolaldehyd kann Aminoacetaldehyd ent-

---

[1]) Helvet. Chim. Acta 4.

[2]) Die Naturwissenschaften 8, 383, 1920.

[3]) Klin. Wochenschr. 1. Jahrg. Nr. 3, 105, 1922.

stehen, aus dem sich Colamin und Glykokoll bilden können. Durch Methylierung entsteht dann das Cholin. Später modifizierte *Trier* seine Meinung dahin, das Cholin bilde sich aus dem Glykolaldehyd durch Amidierung eines stickstofffreien Glykollecithins. Diese beiden Auffassungen haben keinen großen Anhang in der Wissenschaft gefunden.

In der letzten Zeit hat *Karrer* eine neue Theorie über die Bildungsweise der Choline im Organismus aufgestellt, und sie auch im weiten Maße experimentell bewiesen. *Karrer*[1]) nimmt als ersten wichtigen Vorgang im Organismus die Reduktion an. Er hat nachgewiesen, daß die natürlichen Aminocarbonsäuren (Alanin, Leucin, Phenylalanin usw.) leicht zu Aminoalkoholen reduziert werden. Durch Methylierung lassen sich die entsprechenden Aminoalkohole in die zugehörigen Choline verwandeln. „Es ist möglich“, nimmt *Karrer* an, „daß auch andere Aminosäuren nicht nur das des Glykokolls, der Reduktion anheimfallen und daß gelegentlich auch andere Aminoalkohole bzw. andere Choline in Organen nachzuweisen sein werden“. Es ist ihm auch gelungen im Laboratorium von verschiedenen Aminosäuren ausgehend die entsprechenden Choline synthetisch darzustellen. *Karrer* nennt diese neuen Choline „*proteinogene*“ in Analogie zu den proteinogenen Aminen. Bisher sind die proteinogenen Choline aus Alanin, Leucin und Tyrosin dargestellt worden. Für die gütige Überlassung dieser Stoffe sprechen wir Herrn Prof. *Karrer* an dieser Stelle unseren verbindlichen Dank aus.

Folgende Substanzen sind von uns in Form ihrer Jodsalze untersucht worden:

A. Acetylierte Choline:

1. Alaninacetylcholin,
2. Leucinacetylcholin,
3. Phenylalaninacetylcholin,
4. Tyrosinacetylcholin und
5. Methyltyrosinacetylcholin.

B. Nicht acetylierte Choline:

6. Phenylalanincholinjodid,
7. Tyrosincholinjodid und
8. Methyltyrosincholinjodid (ein Methylester des Tyrosincholinjod).

Es war nun unsere Aufgabe, im Tierversuch die pharmakologische Wirkung dieser neuen Choline *Karrers* näher zu analysieren und mit derjenigen des bekannten Cholins zu vergleichen. Je nach dem Resultat könnte dann auf die biologische Bedeutung dieser neuen Eiweißabbauprodukte geschlossen werden.

Methodik und Anlage der Versuche.

Die charakteristische Wirkung des bisher bekannten Cholins ist die Erregung der parasympathischen Endapparate, die bekanntlich

---

[1]) l. c.

durch Atropin voll aufhebbar ist. Sie ist auch bei der hormonalen Wirkung das wesentliche.

Es war zunächst vor allem von Interesse zu wissen, ob die neuen Choline, die proteinogenen Choline, als Synergisten bei den bisher bekannten hormonalen Cholineffekten im Organismus überhaupt in Betracht kommen. Dann war also vor allem einmal zu untersuchen, ob die neuen Choline überhaupt dieselbe typische parasympathische Cholinwirkung entfalten, und wenn ja, in welchen Dosen bzw. in welchen Konzentrationsverhältnissen? Speziell die Schwellenkonzentrationen böten dabei ein Interesse.

Als Testobjekte und Kriterien für die parasympathische Endplattenerregung wählten wir:

1. die Hemmungswirkung am nach *Straub* isolierten Froschherzen,
2. die kontraktionserregende Wirkung am isolierten Kaninchendünndarm, und
3. die erregende Wirkung am isolierten Meerschweinchenuterus.

Riesser und *Neuschloss*[1]) haben eine neue dem bekannten, vom Glykokoll abzuleitenden, Acetylcholin zukommende sehr charakterische Wirkung am isolierten Nerv-Muskelpräparat beschrieben: es ist diese eine sogenannte „Erregungskontraktur", die auf Atropin reversibel ist. Deren Angriffspunkt soll der parasympathische Anteil der „rezeptiven Substanz" im Sinne *Langleys* sein.

Wir haben nun 4. untersucht, ob die neuen Choline ebenfalls diese Kontraktur am isolierten quergestreiften Muskel machen, und zwar am isolierten Nervmuskelpräparat des Frosches.

Alle hier untersuchten neuen Choline und Acetylcholine wurden für die Versuche in Form ihrer Jodsalze benutzt.

I. Alaninacetylcholin.

$$\begin{array}{l} \quad\quad\;\; J—N \equiv (CH_3)_3 \\ \quad\quad\quad\quad | \\ CH_3—CH—CH_2O—(COCH_3). \end{array}$$

a) Die Wirkung auf das isolierte Froschherz.

Das Alaninacetylcholin gibt am Froschherzen die typische, parasympathische Hemmungswirkung des Acetylcholins, ist aber bedeutend schwächer wirksam. Wie wir später sehen werden, ist diese Wirkung durch Atropin reversibel. Die Depressionswirkung auf die Hubhöhen beginnt deutlich zu werden bei der Grenzkonzentration von 1 : 100000.

Die Konzentration von 1 : 50000 bewirkt eine Depression auf ein Drittel der Hubhöhe.

---

[1]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 91, 442.

Die Konzentration von 1 : 20000 bewirkt eine Depression auf zwei Drittel der Hubhöhe (s. Abb. 1).

Bei der Konzentration von 1 : 10000 wird die Hubhöhe auf mehr als um die Hälfte herabgesetzt.

b) Die Wirkung auf den isolierten Kaninchendünndarm.

Auch am Darme wirkt das Alaninacetylcholin dem Acetylcholin qualitativ ähnlich. Wir bekommen die gleiche, parasympathisch angreifende, kontraktionserregende Wirkung, aber in schwächerer Intensität. Während

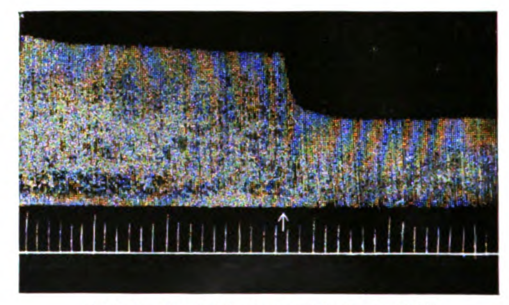


Abb. 1. Bei ↑ Alaninacetylcholin 1 : 20 000.

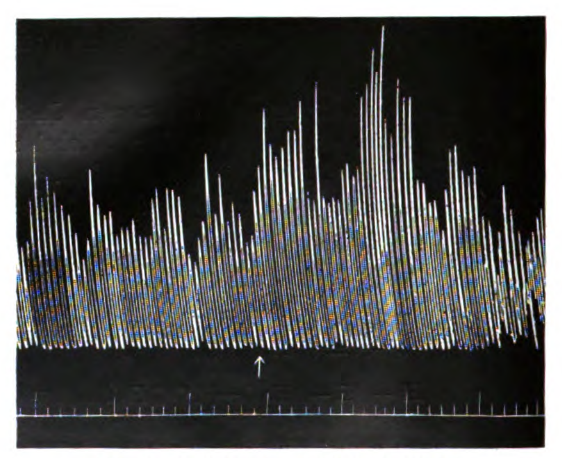


Abb. 2. Bei ↑ Alaninacetylcholin 1 : 1 Million.

wir beim Acetylcholin schon in der Konzentration von 1 : 10 Millarden eine deutliche Tonussteigerung sehen können, bewirkt das Alaninacetylcholin erst in Stärke von 1 : 1 Million eine kaum bemerkbare Zunahme der Pendelbewegungen und eine kleine, nur bei sehr empfindlichen Därmen zu beobachtende Tonussteigerung (s. Abb. 2, Zunahme der Pendelexkursionen bei 1 : 1 Million Alaninacetylcholin).

Bei 1 : 200000 haben wir gelegentlich schon eine deutliche Tonussteigerung von passagerem Charakter. Gewöhnlich liegt doch die Grenz-

konzentration für eine deutliche, aber nur kurz dauernde Kontrakturwirkung für Alaninacetylcholin bei 1 : 100000 (s. Abb. 3).

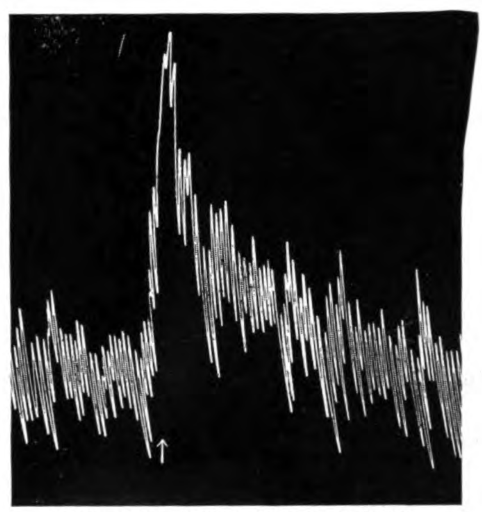


Abb. 3. Bei ↑ Alaninacetylcholin 1 : 100000

c) Die Wirkung auf den isolierten Meerschweinchenuterus.

Mit 1 : 100000 Alaninacetylcholin läßt sich schon eine starke Kontraktur der Uterusmuskulatur erzielen.

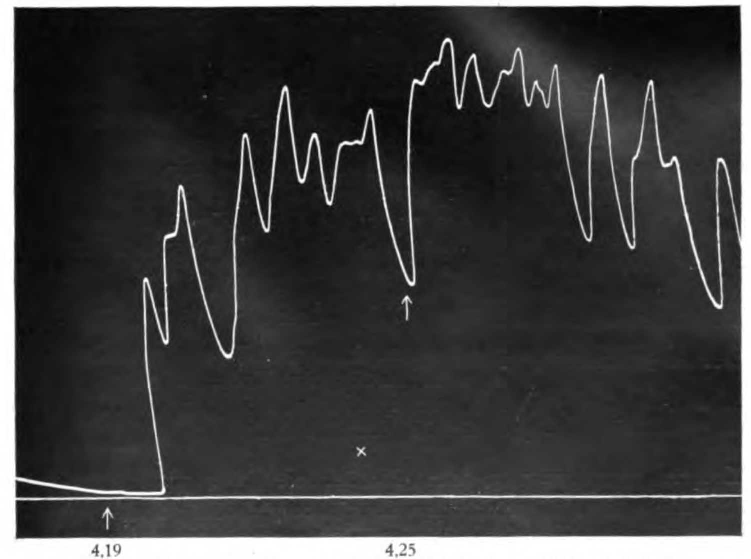


Abb. 4. Meerschweinchenuterus. Bei 4,19 Alaninacetylcholin 1 : 100000. Bei 4,25 zweite Applikation von 1 : 50000.

d) Die Kontrakturwirkung am isolierten Nervmuskelpräparat.

Durch Einwirkung von Alaninacetylcholin erzielen wir eine anhaltende Muskelkontraktur. Mit einer Konzentration von 1 : 50000 Alaninacetylcholin erzielten wir den gleichen Effekt (Kontraktur) wie mit 1 : 100000 Acetylcholin. Bei längerer Einwirkung der Substanz wird die Muskelerregbarkeit geschädigt. Der zeitliche Verlauf dieser Kontraktur stimmt mit derjenigen von *Riesser* und *Neuschloss* beschriebenen mit Acetylcholin überein. Sie ist auf Atropin reversibel, wie die Acetylcholinkontraktur.

Ein Curareeffekt am Nermuskelpräparat war unsicher zu beurteilen, da die direkte Muskelerregbarkeit auf elektrische Reize schon abnimmt. Die Erregbarkeit vom Nerven und Muskel aus nahmen etwa gleich stark ab.

II. Leucinacetylcholin.

$$\begin{array}{c} \quad\quad\quad\quad\quad\quad J{-}N = (CH_3)_3 \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad | \\ {CH_3 \atop CH_3}\!>\!CH{-}CH_2{-}CH{-}CH_2OCOCH_3. \end{array}$$

a) Die Wirkung auf das isolierte Froschherz.

Die Substanz zeigt die typische parasympathische Hemmungswirkung des Cholins. Die Grenzkonzentration ist bei 1 : 100000. Eine Konzentration von 1 : 50000 ruft bereits eine Depression von um ein Fünftel der normalen Hubhöhe hervor. Die Konzentration von 1 : 10000 senkt die Hubhöhe auf etwa ein Drittel der normalen herab.

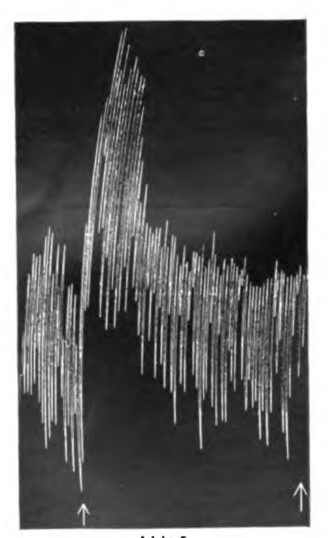


Abb. 5.
Bei ↑ Leucinacetylcholin 1 : 100000.

b) Die Wirkung auf den isolierten Kaninchendarm.

Die minimale Konzentration, bei der noch eine sichtbare Wirkung beobachtet werden könnte, war 1 : 1 Million, gleich wie beim Alaninacetylcholin. Man sah dabei eine leichte Zunahme der Pendelbewegungen, meist kaum eine Tonussteigerung.

Bei 1 : 500000 sehen wir gelegentlich schon eine passagere Kontraktur. Gewöhnlich liegt die erste deutliche Kontrakturwirkung im Mittel wie beim Alaninacetylcholin, auch beim Leucinacetylcholin bei 1 : 100000 (s. Abb. 5).

c) Die Wirkung auf den Uterus.

Am isolierten Uterus ruft das Leucinacetylcholin eine Kontraktur hervor, die mit derjenigen des Acetylcholins nur qualitativ, mit der des Alaninacetylcholins qualitativ und quantitativ identisch ist.

d) Kontrakturwirkung am isolierten Nervmuskelpräparat.

Am Skelettmuskel wirkt das Leucinacetylcholin schwächer als das Alaninacetylcholin. Die Qualität der Wirkung entspricht der des Acetylcholins, also Kontrakturwirkung via parasympathisches System der Muskelinnervation.

III. und IV. Tyrosinacetylcholin und Methyltyrosinacetylcholin.

$$\mathrm{HO}\langle\ \rangle \mathrm{CH_2{-}\overset{\overset{\displaystyle JN\equiv(CH_3)_3}{|}}{C}H{-}CH_2OCOCH_3}.$$

a) Die Wirkung auf das Froschherz.

Beide haben die typische parasympathische Hemmungswirkung wie die übrigen neuen acetylierten Choline. Der Effekt der Wirkung ist aber bedeutend schwächer. Sie bewirken erst in sehr hohen Konzentrationen, und zwar von 1 : 10000 und 1 : 5000 Depressionen der Hubhöhen. Tyrosinacetylcholin bewirkt in der Konzentration 1 : 5000 am Herzen eine kleine, hie und da von selbst vorübergehende Depression. Eine deutliche nicht passagere Wirkung sehen wir bei sehr hohen Konzentrationen wie 1 : 1000. Das Methyltyrosinacetylcholin ist noch viel schwächer.

b) Die Wirkung auf den Darm.

Die beiden Substanzen wirken auf den Darm schon in der Konzentration von 1 : 100000 erregend. Wir sehen eine Zunahme der Pendelbewegungen sowie eine leichte Tonussteigerung.

Quantitative Vergleiche.

Am Darme wirkt das Alaninacetylcholin etwas stärker als das gewöhnliche Cholinchlorid. Es ruft eine bedeutende Tonussteigerung und Zunahme der Pendelbewegung hervor, bei einer Konzentration von 1 : 100000, wo Cholinchlorid in der gleichen Konzentration am gleichen Darmstück nur eine kleine Tonussteigerung hervorruft.

Alaninacetylcholin scheint in seiner parasympathischen Wirkung um ein Geringes stärker aktiv zu sein, als das Leucinacetylcholin. Letzteres kommt in seiner Wirkungsstärke etwa dem gewöhnlichen Cholinchlorid gleich.

Die nächste Substanz der Stärke nach ist das Tyrosinacetylcholin. Es wirkt bedeutend schwächer als Leucinacetylcholin. Am schwächsten von allen ist Methyltyrosinacetylcholin.

Verglichen mit dem bekannten Acetylcholin verhalten sich die Grenzkonzentrationen am Darm etwa wie 1 : 10 Millionen für das Acetylcholin, zu 1 : 100000 beim Alanin- und Leucinacetylcholin. Also die aktivsten der neuen Acetylcholine sind etwa 100- bis 1000mal schwächer wirksam als das gewöhnliche Acetylcholin und etwa gleich stark wie das Cholin.

Reversibilität und Antagonismus.

Sowohl am Herzen, wie auch am Darme oder den übrigen Organen läßt sich die Cholinwirkung durch Auswaschen mit frischer Ringerlösung reversibel machen. Die Reversibilität ist bekanntlich unter anderem von zwei Faktoren abhängig: 1. von der angewandten Konzentration und 2. der Kontaktdauer von Gift und Organzelle. Bei den von uns angewandten Konzentrationen und der Kontaktdauer von Maximum 3 Minuten war die Reversibilität nach Auswaschen stets eine totale und die Normalfunktion trat sehr rasch ein. In der Abb. 6 sehen wir die Erholung durch Auswaschen.

Wichtig war der Antagonismus gegenüber Atropin; denn in ihm hatten wir das Hauptkriterium des parasympathischen Charakters der Wirkung der neuen Choline und damit auch die wichtigste Übereinstimmung mit der Wirkung der bekannten Choline.

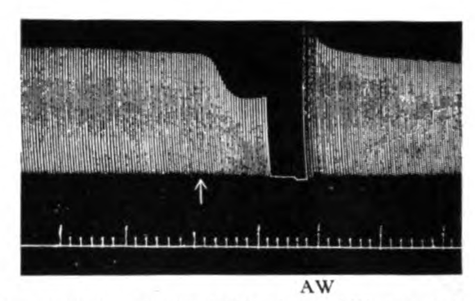


Abb. 6. Bei ↑ Alaninacetylcholin 1 : 10000. Stillstand. Bei AW. Auswaschen mit Ringerlösung.

Versuchsbeispiel: Alaninacetylcholin 1 : 10000 bewirkte eine Abnahme der Hubhöhe um mehr als die Hälfte. Nach der Zugabe von Atropin 1 : 10000 erholt sich das Herz sofort. In der Abb. 7 ist der gleiche Versuch mit Cholinchlorid gemacht worden (s. Abb. 7 und 8).

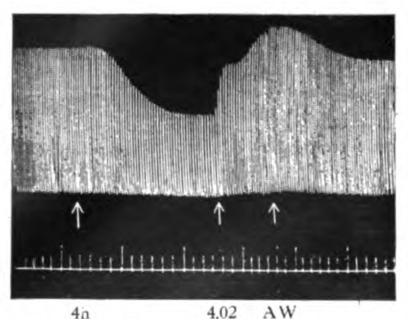


Abb. 7. Bei ↑ 4 h Cholinchlorid 1 : 10000. Bei ↑ 4,02 Atropin 1 : 10000

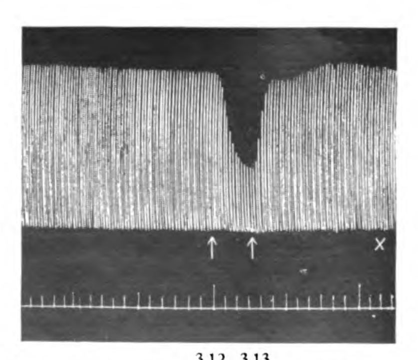


Abb. 8. Bei 3 h 12′ Alaninacetylcholin 1 : 10000. Bei 3 h 13′ Atropin 1 : 10000

Antagonismusversuche am Darme.

Acetylcholin 1 : 50000 bewirkt durch Erregung der Vagusendigungen eine tonische Kontraktur, die durch Atropin 1 : 100000, wie bekannt, glatt aufgehoben wird.

Alaninacetylcholin ruft mit 1 : 10000 eine tonische Kontraktur hervor. Nach Zugabe von Atropin 1 : 100000 wird die Kontraktur prompt aufgehoben und bald darauf nimmt das Darmstück seine normale Tätigkeit auf (s. Abb. 9).

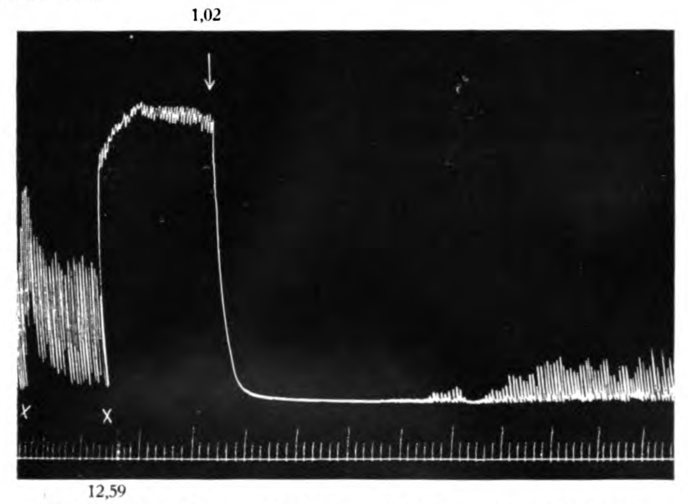


Abb. 9. 12h 59′ Alaninacetylcholin 1 : 10000. 1 h 02′ Atropin 1 : 100000

B. Die nicht acetylierten Choline.

VI. Phenylalanincholinjodid.

$$\begin{array}{c} J\text{—}N \equiv (CH_3)_3 \\ | \\ CH_2\text{—}CH\text{—}CH_2OH. \end{array}$$

a) Wirkung auf das Froschherz.

Phenylalanincholinjodid bewirkt am Herzen bei 1 : 1000 eine deutliche Zunahme der Hubhöhe, die von der Empfindlichkeit des Herzens abhängig, einen verschieden starken Ausschlag zeigt (s. Abb. 10).

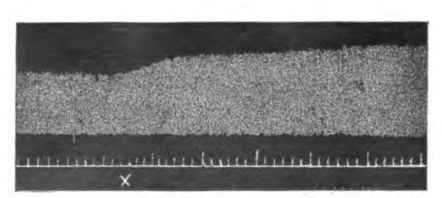


Abb. 10. Bei × 5,25 Phenylalanincholinjod 1 : 1000.

Diese erregende Wirkung auf das Herz ist vielleicht in Parallele zu setzen mit der ähnlichen des chemisch verwandten Tyramins.

Mit stärkeren Dosen erzielen wir eine Depression, die schon gelegentlich mit 1 : 500 einen diastolischen Herzstillstand herbeiführt. Auf Atropin ist weder die Depression, noch der Herzstillstand reversibel. Die Depression muß wahrscheinlich *myotroper* Natur sein.

Die sympathische Natur der Tonussteigerung bei kleineren Dosen können wir durch die Vorbehandlung mit Ergotamin verneinen. Ebenso dachten wir diese Hubhöhenzunahme mit der adsorptiven Verdrängung, wie sie beim Campher auftritt, in Analogie zu bringen. Auch diese Versuche sind negativ ausgefallen und wir können nicht genau angeben, welchen Charakter diese erregende Herzwirkung hat.

b) Die Wirkung auf den Darm.

Am Darme haben wir die gleichen Wirkungen wie bei den acetylierten Cholinen, mit dem Unterschied, daß hier die Wirkung in viel stärkeren Konzentrationen auftritt, sie ist ebenso passagerer Natur, geht aber auf Atropin nicht zurück (s. Abb. 11).

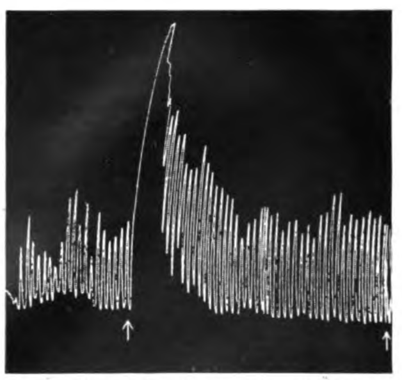


Abb. 11. Bei ↑ Phenylalanincholinjodid 1 : 10000.

Mit größeren Konzentrationen bekommen wir gelegentlich Tonussenkungen, die rein *myotroper* Natur sind.

Am *Uterus* traten mit größeren Dosen (1 : 500) Kontrakturen auf, die aber nicht nervöser Natur sind und ebenso myotropen Charakter haben müssen.

VII. und VIII. Tyrosincholinjodid und Methyltyrosincholinjodid.

Die beiden Substanzen wirken auf das Herz in schwächeren Dosen leicht amplitudensteigernd. So treten bei 1 : 10000 und noch gelegentlich bei 1 : 5000 Hubhöhenzunahmen auf um ein Fünftel der normalen Hubhöhe. Mit 1 : 1000 treten Depressionen auf infolge Muskelschädigung, also ebenso myotroper Natur. Am stärksten ist die errregende Wirkung zu sehen bei mit Ca-freier Ringerlösung vergifteten Herzen.

Am Darme und Uterus traten die gleichen Erscheinungen auf, wie beim Phenylalanincholinjodid. Die Wirkungen waren etwas schwächer, hatten aber den gleichen Charakter.

Versuche über die Wirkung der proteinogenen Choline auf das intakte Tier.

1. *Blutdruck* (am Kaninchen). Auch mit den größten Dosen intravenös gegeben, konnten wir keine *vagotrope* Blutdrucksenkung, wie sie von den Cholinen bekannt ist, beobachten. Wir haben Alaninacetylcholin bis zu 25 mg pro Kilogramm intravenös injiziert, aber ohne Einfluß; während Acetylcholin schon mit 5 mg pro Kilogramm eine geringe, aber deutliche Blutdrucksenkung hervorruft.

Wir haben auch die anderen Choline in kleinen Dosen injiziert, aber auch ohne Wirkung.

2. *Atmung.* Die Atmung läßt sich nicht durch die proteinogenen Choline beeinflussen.

3. *Speichelsekretion.* Während Acetylcholin mit 5 mg pro Kilogramm Tier eine deutliche (von relativ kurzer Dauer) Zunahme der Speichelsekretion hervorruft, haben wir keinen Effekt auch mit 25 mg pro Kilogramm gesehen.

4. *Pupille.* Die Katzenpupille ist sowohl bei intravenöser, wie auch bei lokaler (1 Proz.) Applikation unbeeinflußbar.

Offenbar besteht ein starkes Mißverhältnis zwischen der relativ starken parasympathischen Wirkung der neuen, proteinogenen acetylierten Choline einerseits und der Wirkung auf das intakte Tier andererseits. Parasympathische Effekte haben wir bei intravenöser Applikation überhaupt nicht erzielen können. Das erklärt sich wohl nach der Meinung von *Lenz* daraus, daß wahrscheinlich die proteinogenen Acetylcholine noch leichter von der Esterase des Blutes entacetyliert werden, als das bekannte Acetylcholin. Damit ist wohl gesagt, daß die neuen Choline am intakten Organismus überhaupt keine Wirkung entfalten. Wirkungen am Orte der Entstehung (z. B. Darmwand) sind ja trotz der Labilität möglich. Hingegen scheinen Resorptivwirkungen unserer Choline unwahrscheinlich.

Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlußfolgerungen.

P. Karrer hat gezeigt, daß aus einer ganzen Anzahl von natürlichen Aminosäuren des Eiweißes, wie Alanin, Leucin und Tyrosin, durch einfache chemische Eingriffe, wie Reduktion und Methylierung, die den Aminosäuren entsprechenden Choline synthetisch gewonnen werden können. Damit hat er wahrscheinlich denjenigen Weg aufgedeckt, den auch der lebende Organismus bei der Produktion des in zahlreichen Organen vorkommenden, dem Glykokoll nahestehenden, bekannten Cholins nimmt. Und ferner hat er auch wahrscheinlich gemacht, daß neben und parallel zum bekannten Glykokollcholin bei proteolytischen Prozessen im Organismus sich eine größere Anzahl von anderen, natürlichen proteinogenen Cholinen bilden könnten.

Wir haben nun die physiologische und pathophysiologische Bedeutung dieser neuen proteinogenen Choline durch die Analyse ihrer wichtigsten pharmakologischen Wirkungen zu beweisen gesucht.

Die von uns untersuchten neuen proteinogenen Choline *Karrers* waren Alanincholin, Leucincholin und Tyrosincholin sowie dessen Methylester. Sie zeigten nun im Versuch alle die bekannten Endplattenwirkungen des Cholins, aber nur die acetylierten Formen dieser

Choline. Diese neuen proteinogenen Acetylcholine zeigten z. B. die parasympathische Hemmungswirkung am isolierten Froschherzen, die kontraktionserregende Wirkung am isolierten Darme, die Kontrakturwirkung am isolierten Uterus und die Kontrakturwirkung auf den parasympathischen Teil der rezeptiven Substanz am isolierten Skelettmuskelpräparat.

Wenn somit die neuen proteinogenen Acetylcholine qualitativ in allem wesentlich mit den Wirkungen des bekannten Glykokollcholins und seines Acetylderivats übereinstimmen, so bestehen doch beträchtliche quantitative Differenzen. So wirkt das gewöhnliche Acetylcholin (vom Glykokoll) etwa 100- bis 1000mal stärker parasympathisch erregend am Herzen und Darme, als die stärkst wirksamen neuen proteinogenen Choline ebenso in ihrer acetylierten Form, nämlich Alanin- und Leucinacetylcholin. Trotzdem ist die Wirkung der letzteren stark gering, wenn sie als biologische Synergisten des bekannten natürlichen Cholins in Betracht kommen. Und zwar ist dabei denkbar, daß die neuen proteinogenen Choline neben dem Glykokollcholin z. B. auch im Darme als Begleithormone eine Rolle spielen. Ferner erhellt aus unseren Versuchsresultaten die Möglichkeit, daß bei toxischem Eiweißzerfall — Infektionskrankheiten, Darmfäulnis — im Organismus nicht nur proteinogene Amine starke und für pathologische Erscheinungen bedeutsame pharmakologische Wirkungen auslösen können, sondern ebensogut eine ganze Anzahl natürlicher, proteinogener Choline. Einen noch besseren Beweis für diese Wahrscheinlichkeitsannahme hätten wir allerdings dann, wenn diese neuen proteinogenen Choline im Organismus selber oder in den Organen chemisch nachgewiesen werden könnten, speziell bei pathologischen proteolytischen Prozessen.

Die parasympathische Wirkung der neuen Acetylcholine war nur am isolierten Organ zu beobachten, nicht aber am intakten Organismus, auch nicht bei intravenöser Injektion großer Dosen. Die Erklärung dieses Wirkungsverlustes in situ dürfte wohl die sein, daß die Esterase des Blutes die neuen Acetylcholine noch rascher zersetzt als das gewöhnliche Acetylcholin, und also im Organismus rasch in die unwirksamen, nicht acetylierten Choline überführt werden. Damit wird es wahrscheinlich, daß sie im Organismus wohl hauptsächlich nur am Orte ihrer Bildung biologische Wirkungen hervorrufen.

In nicht acetylierter Form fehlte bei den neuen Cholinen die charakteristische parasympathische Erregungswirkung. Hingegen hatten Tyrosincholin, sein Methylester und Phenylalanincholin in hohen Konzentrationen (1 : 10000 bis 1 : 2000) eigentümlicherweise schwach erregende Wirkungen auf das isolierte Froschherz; manchmal waren mit diesen Substanzen Hemmungswirkungen am Darme zu erzielen. Den Charakter dieser Wirkungen konnten wir nicht eruieren,

da sie nicht regelmäßig auftraten; möglicherweise könnte in diesen Substanzen auch eine sympathicuserregende Wirkung vorhanden sein. Die Sympathicuswirkung der biogenen Tyrosincholingruppe erinnert an die gleichartige Wirkung eines chemisch ihm nahestehenden biogenen Amins: des Tyramins. In ganz hohen Dosen wirkten diese Stoffe alle myotrop lähmend.

Zusammenfassung.

Die von *Karrer* synthetisch hergestellten Choline haben qualitativ die gleiche Wirkung wie das bekannte Acetylcholin, allerdings nur in acetylierter Form. Die Wirkung trat aber nur an den isolierten Organen auf. In situ blieben die parasympathisch erregenden Wirkungen aus. Damit ist wahrscheinlich der Weg aufgedeckt, den der lebende Organismus einnimmt bei der Herstellung des Cholins.

Herrn Prof. Dr. *E. Bürgi* und Herrn P. D. Dr. *E. Lenz* bin ich an dieser Stelle für ihre Hilfe bei der Ausführung der Arbeit dankbar.

Weiteres zur Phosphorylierung des Zuckers.

Von

C. Neuberg und **M. Kobel.**

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

Vor einiger Zeit haben wir mitgeteilt[1]), daß der Akt der Phosphorylierung des Zuckers (Fructose, Glucose) weder bei der natürlichen schwach sauren Reaktion noch im alkalischen Medium durch Cyankaliumlösung gehemmt wird; sogar n/50 KCN wird vertragen. Diese Versuche sind sowohl mit Trockenhefe als mit Mazerationssaft ausgeführt worden. Wir haben daraus den Schluß gezogen, daß die Vorgänge bei der Veresterung von Zucker mit Phosphorsäure — wohl wie die meisten hydrolytischen Prozesse und ihre Umkehrungen — keine Schwermetall-katalysen darstellen. Es ist dies auch deshalb wahrscheinlich, weil nach unserer bisherigen Kenntnis Schwermetalle sich nur am Zustandekommen eines oxydativen Abbaues beteiligen.

Im Hinblick auf die früher erwähnte Arbeit von *H. A. Spoehr*[2]), daß eine Pyrophosphat-verbindung des Eisens, nämlich das Komplexsalz Natrium-Ferro-pyrophosphat, $Na_8Fe_2(P_2O_7)_3$, auf alle Hexosen sowie bestimmte Disaccharide atmosphärischen Sauerstoff[3]) zu übertragen vermag, haben wir nunmehr geprüft, ob das in so ausgesprochener Weise komplexbildende Ion der Pyro-phosphorsäure einen Einfluß auf den Ablauf der biologischen Phosphorylierung ausübt. Die Verwendung von Natrium-pyro-phosphat bietet zugleich den Vorteil, daß diese Verbindung in Lösung vorhandenes Eisen schon bei neutraler (oder schwach alkalischer) Reaktion zu maskieren vermag.

Versuche.

I. 10 g Fructose wurden in 50,0 ccm 0,3 mol. Dikaliumphosphat gelöst, 5 g Trockenunterhefe, 2 ccm Toluol sowie 3,0 ccm n Natrium-pyro-phosphatlösung hinzugegeben; das Gemisch blieb im Brutschrank bei 30⁰ stehen (Volumen 60 ccm, Pyrophosphat-konzentration also

[1]) *C. Neuberg* und *M. Kobel*, diese Zeitschr. **155**, 499, 1925.

[2]) *H. A. Spoehr*, Chem. Centralbl. **1924**, II, 937.

[3]) Außer den in unserer letzten Mitteilung über diesen Gegenstand zitierten Autoren haben auch *J. U. Nef* (Amer. Chem. Soc. **42**, 406, 1909) sowie *H. A. Spoehr* (ebendaselbst **43**, 230, 1910) darauf aufmerksam gemacht, daß die Zucker mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen im Molekül durch den Luftsauerstoff in alkalischer Lösung angegriffen werden und dabei CO_2 sowie andere Abbauprodukte liefern.

= n/20). Zu Beginn des Versuchs wurden 3,0 ccm der Flüssigkeit mit 6,0 ccm 2½proz. Ammoniaks versetzt, klar filtriert und davon 2,0 ccm, entsprechend $^2/_3$ ccm der Urlösung, mit Magnesiamixtur kalt gefällt. In Abständen von je einer Stunde wurden weitere Bestimmungen des freien Phosphats in gleicher Weise vorgenommen. Zu denselben Zeiten wurden auch die Wasserstoff-ionen-konzentrationen ermittelt.

II. a) Zum Vergleich wurde derselbe Versuch ohne Zugabe von Natrium-pyro-phosphat ausgeführt.

	I		IIa	
	$Mg_2P_2O_7$ g	p_H	$Mg_2P_2O_7$ g	p_H
Anfangsbestimmung	0,0176	7,6	0,0170	7,0
Nach 1 Std.	0,0020	6,8	0,0000	6,8

b) In einem anderen Vergleichsversuch wurde in 3,0 ccm n Natrium-pyro-phosphatlösung für sich allein, die zuvor auf 60 ccm verdünnt waren, die fällbare Magnesiumphosphatmenge festgestellt. Aus $^2/_3$ ccm Urlösung, die dem Pyro-phosphatgehalt bei den Göransätzen entsprachen, wurden 0,0017 g $Mg_2P_2O_7$ erhalten.

III. Der folgende Versuch wurde in derselben Weise ausgeführt wie der erste hier beschriebene; durch Beimischung von 1,0 g Natriumbicarbonat wurde die Alkalinität gesteigert.

IV. Vergleichsversuch zu III, ohne Pyrophosphat.

	III		IV	
	$Mg_2P_2O_7$ g	p_H	$Mg_2P_2O_7$ g	p_H
Anfangsbestimmung	0,0169	8,2	0,0179	8,2
Nach 1 Std.	0,0162	8,0	0,0106	7,5
„ 2 „	0,0016	7,6	0,0000	7,5

V. Ansatz wie Versuch I. Zur Erhöhung der p_H-Zahl wurden 1,5 g Natriumbicarbonat hinzugegeben.

VI. Vergleichsversuch zu V, ohne Anwendung von Natriumpyrophosphat.

	V		VI	
	$Mg_2P_2O_7$ g	p_H	$Mg_2P_2O_7$ g	p_H
Anfangsbestimmung	0,0181	8,4	0,0174	8,4
Nach 1 Std.	—	8,4	0,0164	8,4
„ 2 „	—	8,3	0,0158	8,2
„ 3 „	—	8,3	0,0000	7,7
„ 6 „	0,0167	8,3		
„ 22 „	0,0024	7,5		
„ 25 „	0,0019	7,5		

Es zeigt sich also, daß auch in Anwesenheit von pyro-phosphorsauren Salzen wie die Vergärung[1]), so auch der Vorgang der Phosphorylierung ungestört vonstatten geht. Dabei ist es einerlei, ob man in alkalischem oder neutralem Medium arbeitet. In neutraler Lösung verzögert das Pyrophosphat den Vorgang der biochemischen Phosphorylierung nicht merkbar, in alkalischer ist eine Verlangsamung der Umsetzung zu konstatieren, ganz in Analogie zu unseren früher gemachten Angaben über den Einfluß des Kaliumcyanids. Die Ionen des Pyrophosphats werden übrigens unter den herrschenden Bedingungen in den Phosphorylierungsprozeß nicht einbezogen; d. h. ein gärtüchtiges System, das *Apozymase* und *Cozymase* enthält[2]), verwertet allem Anscheine nach Pyro-phosphate nicht bei der Bereitung von Zucker-phosphorsäure-estern (s. den ziemlich konstanten Schlußwert von 0,0016 bis 0,0020 g $Mg_2P_2O_7$). Gleichzeitig als Dikaliumsalz anwesende Ortho-phosphorsäure wird hingegen in bekannter Weise und bei geeigneten Bedingungen vollständig in organische Bindung übergeführt.

Somit ergeben auch die Pyro-phosphat-Versuche keinen Anhalt dafür, daß entionisierbare Metalle, insbesondere Eisen, bei dieser Erscheinung eine Rolle spielen.

---

[1]) *C. Neuberg* und *W. Ursum*, diese Zeitschr. **110**, 193, 1920.

[2]) Über die Begriffsbestimmungen siehe *C. Neuberg* in Oppenheimers Handbuch der Biochemie II, 456, 1924. *Apozymase und Cozymase bilden zusammen das System der komplexen gärkräftigen Zymase.* Apozymase ist der Zymasebestandteil, der nach Entfernung von Cozymase als coctolabiler Rest hinterbleibt.

Berichtigung

zur Mitteilung von *L. Lorber*, diese Zeitschr. **158**, 205, 1925.

a) Auf S. 207 in der vierten Zeile unter der Überschrift „Die Bestimmung" muß es heißen:

1 ccm von der $\overline{aa}$-Mischung statt
1 ccm von der Mischung.

b) Auf S. 209 in der Anmerkung 1, zweite Zeile, soll es heißen *Stichwunde* statt Stirnwunde.

Autorenverzeichnis.



